

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Silva Lilleorg

Ribosoomide heterogeensusest *Escherichia coli* L31 näitel

Magistritöö

Juhendaja: *PhD* Aivar Liiv

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1. Ribosoom.....	6
1.1. Ribosoomi 30S subühik	6
1.2. Ribosoomi 50S subühik	8
1.3. Ribosomaalsete valkude omadused.....	10
1.4. Ribosomaalsed valgud L31 ja L36.....	10
1.5. Subühikute vahelised sillad. L31 ja sild B1b	12
2. Ribosoomide heterogeensus	16
2.1. Heterogeensus rRNA tasemel	17
2.2. Heterogeensus r-valkude tasemel.....	19
2.3. Ribosoomi filtri hüpotees	23
EKSPERIMENTAALNE OSA	26
1. Töö eesmärk	26
2. Materjal ja meetodika.....	27
2.1. Bakteritüved ja plasmiidid	27
2.2. Söötmed.....	28
2.3. Generatsioonaja määramine	29
2.4. L31A ja L31B üleekspressiooniplasmiidide konstrueerimine	29
2.5. Valkude L31A ja L31B ekspressioon ja puhastamine	31
2.6. Ribosoomide eraldamine.....	33
2.7. Ribosoomide profiil.....	35
2.8. <i>In vitro</i> assotsiatsioonikatse	36
3. Tulemused ja arutelu	37
3.1. Kasvufenotüübi analüüs	37
3.2. Ribosoomide analüüs <i>in vivo</i>	45
3.3. L31A ja L31B ekspressioonivektorite konstrueerimine.....	48
3.4. Ribosoomi valgu L31 paraloogide L31A ja L31B puhastamine.....	51
3.5. Subühikute assotsiatsioon	55
KOKKUVÕTE	71

SUMMARY	72
KASUTATUD KIRJANDUS	74
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	81
LIHTLITSENTS.....	82

KASUTATUD LÜHENDID

aSD – anti-Shine-Dalgarno

GST – glutatioon-S-transferaas

IPTG - *isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*

lmRNA – liiderjärjestuseta mRNA

MBP – maltoosi siduv valk (*maltose binding protein*)

OV puhver – *overlay* puhver

PTC – peptidüültransferaasne tsenter

rcf – suhteline tsentrifugaaljõud (*relative centrifugal force*)

RFHR - radikaalivaba ja eriti redutseeriv 2D geelelektroforees (*radical free and highly reducing two-dimensional electrophoresis*)

rpm – pööret minutis (*revolutions per minute*)

SDS-PAAG - naatriumdodetsüülsulfaat-poliakrüülamiid geelelektroforees (*sodium dodecyl sulfate*)

TEV - *Tobacco Etch Virus*

TP50 – 50S subühikust eraldatud totaalk (total protein)

TX-100 – triiton X

SISSEJUHATUS

Ribosoomi olulisus seisneb valgusünteesi läbiviimises nii prokariootses kui eukariootses maailmas. Valgusüntees kui üks eluprotsesside toimumise põhieeldusi on oma universaalsuses ja mitmekesisuses pälvinud aastakümneid teaduslikku tähelepanu.

Kuigi ribosoomi ja laiemalt valgusünteesi uuringutes tõstetakse esile selle universaalset mehhanismi ja levikut, on üha enam hakatud keskenduma translatsiooni regulatsioonile. Seoses ribosoomide struktuurse heterogeensuse avastamisega nii prokariootidel kui eukariootidel on hakatud spekulerima ribosoomi kui võimaliku uue valgusünteesi regulatsiooni taseme üle.

Ribosoom on ribonukleoproteiinpartikkel, mis koosneb ribosomaalsest RNA-st ja ribosomaalsetest valkudest, mis moodustavad suure ja väikese subühiku. Prokariootne ribosoom sisaldab kolm RNA molekuli ja rohkem kui 50 valku. *E. coli* kui ribosoomibioloogia põhilise mudelorganismi ribosoomide heterogeensust on näidatud nii valkude kui RNA tasemel, samuti on esimesi tõendeid heterogeensuse funktsionaalsusest.

Käesoleva töö teema on ribosoomide heterogeensus ribosoomi valkude tasemel, lähtudes *E.coli*'s avastatud L31 valgu geeni duplikatsioonidest (Makarova jt., 2001) ja selle valgu variantide lülitumisest ribosoomi (Tammsalu, 2012). Eksperimentaalse osa eesmärk on välja selgitada, kuidas L31 variandid mõjutavad bakterite kasvu ja subühikute assotsiatsiooni *in vivo* ja *in vitro*.

Kirjanduse ülevaade koosneb kahest osast ning käsitleb ribosoomide struktuuri, ribosoomi valkude omadusi ja paralooge (esimene peatükk) ning ribosoomide heterogeensust (alused, teke, funktsioonid) nii RNA kui valkude tasemel (teine peatükk).

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Ribosoom

Ribosoomi fundamentaalne tähtsus avaldub tema funktsioonis – valgusünteesi läbiviimises kõikides eludomeenides. Ribosoomi ülesanne on transleerida ehk tõlkida mRNA kaudu vahendatud geneetiline info nukleotiidide keelest valkude aminohappelisse keelde. Seda tõlketööd tuleb teha kiiresti, et kindlustada raku õigeaegne vastus keskkonnatingimustele, ja täpselt, et sõnum tõlkimise käigus ei moonduks (Frank, 2000). Valgusünteesi optimaalse kiiruse saavutamine ja säilitamine ilma järeleandmisteta selle täpsuses on ribosoomile väljakutse, mida „lahendatakse“ ühelt poolt kompleksse struktuuri ja teisalt mitmete translatsioonifaktorite abiga (Frank, 2000).

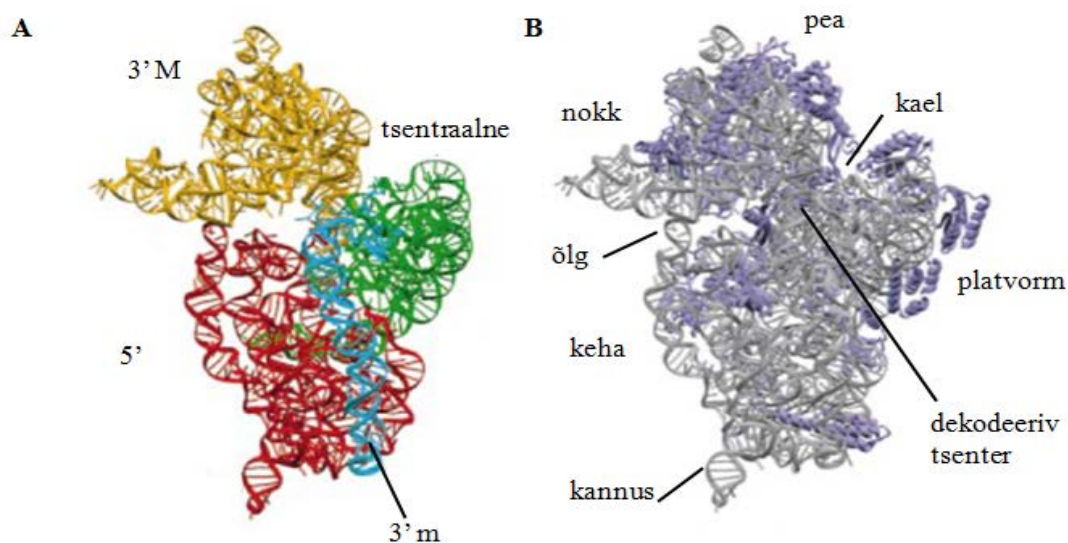
Ribosoom on kõigis rakkudes esinev ribonukleoproteiinpartikkel, mis *eo nomine* koosneb ribosoomi RNA-st (rRNA) ja ribosomaalsetest valkudest (r-valgud), kusjuures mõlemad komponendid kuuluvad kummagi subühiku koosseisu. Ribosoom koosneb kahest erineva suurusega alaühikust, mida tähistatakse nende sedimentatsioonikoefitsientide järgi Svedbergi ühikutes (S): väikesed ehk 30S (prokariöödid) ja 40S (eukariöödid) ja suured ehk 50S ja 60S subühikud. Valgusünteesi initsiatsioonil ühinevad väike ja suur subühik vastavalt 70S või 80S ribosoomiks. Tulenevalt käesoleva magistritöö spetsiifikast keskendub kirjanduse ülevaade prokariöödi ribosoomiga seotud temaatikale, mis käsitletakse rõhuasetusega *Escherichia coli*'l kui levinud ja töö eksperimentaalses osas kasutatud mudelorganismil.

Prokariöödi ribosoomist molekulaarmassiga $2,6 \cdot 10^6$ Da moodustab rRNA ligikaudu 2/3 ja r-valgud 1/3 (Ban jt., 2000). *E. coli* ribosoom sisaldab kolme rRNA-d (16S, 5S, 23S) ja 54 r-valku (S1–S21 ja L1–L36) (Stelzl jt., 2001).

1.1. Ribosoomi 30S subühik

Prokariöödi ribosoomi väike subühik koosneb 16S rRNA-st ja sellega seondunud ribosoomi valkudest. 16S rRNA sekundaarstruktuuris eristatakse nelja domeeni – 5', tsentraalne, 3' M(ajor), 3'm(inor) (Wittmann, 1982) –, millest heeliksiite edasise pakkimise tulemusena tekkinud tertsiaalstruktuur annab aluse 30S subühiku morfoloogiale (joonis 1A; Wimberly jt.,

2000). 16S rRNA tertsiaalstruktuur ja sellega seondunud r-valgud moodustavad 30S subühikule iseloomuliku väliskuju (joonis 1B): keha (koos õla ja kannusega), pea (koos nokaga) ja platvormi (joonis 1B; Wimberly jt., 2000). Keha moodustavad 16S rRNA 5' ja 3' m domeenid koos r-alkudega S4, S5, S12, S16, S17 ja S20, pea koosseisu kuuluvad 3' M domeen koos S2, S3, S7, S9, S10, S13, S14 ja S19-ga ning platvormis on tsentraalne domeen ja S1, S6, S8, S11, S15, S18 (Wilson ja Nierhaus, 2005). *E. coli* 16S rRNA-s on 1542 nukleotiidi (Wilson ja Nierhaus, 2005)



Joonis 1. 30S subühik vaatega 50S subühiku poolt. (A) 16S rRNA sekundaarstruktuuri neli domeeni – 5', tsentraalne, 3' M ja 3' m – moodustavad iseseisvad üksused ka tertsiaalstruktuuris. (B) 16S rRNA tertsiaalstruktuur (hall) ja r-valgud (sinine) moodustavad 30S subühiku morfoloogiliselt eristatavad osad: pea (sh nokk), keha (sh õlg ja kannus), platvorm. Dekodeerivat tsentrit tähistab viitjoon. Joonis kohandatud artiklist Wimberly jt., 2000.

E. coli 30S subühikus on esindatud 21 r-alku (*small* ehk S1–S21), mille primaarstruktuur (Wittmann, 1982) ja asukoht ribosoomis on teada *T. thermus*'e 30S kristallstruktuuri alusel (Wimberly jt., 2000). R-alkud on 30S alaühikus jaotunud ebaühtlaselt, koondudes selle tsütoplasmaatilisele poolele ja jättes subühikute kokkupuutepinna peaaegu (ainult S12 asub seal) valguvabaks (joonis 1B; Wimberly jt., 2000).

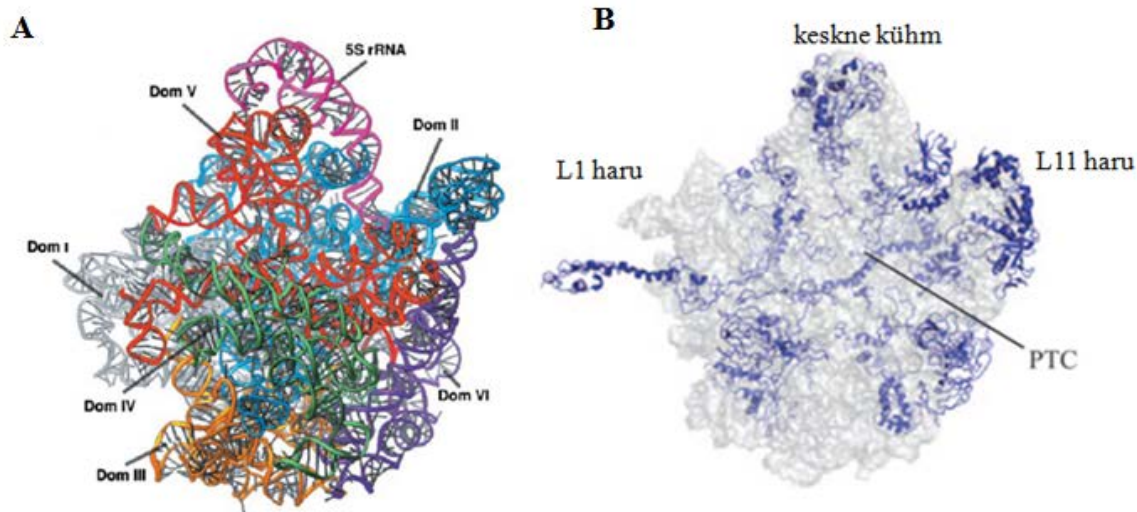
Väikesel subühikul on valgusünteesis mitu olulist rolli: 30S subühik osaleb translatsiooni initsiatsioonil, sidudes nii mRNA-d kui initsiatsioonifaktoreid (Kozak, 1999), samuti toimub seal dekodeerimine ehk mRNA koodonile vastava aminoatsüleeritud tRNA (aa-tRNA) valimine ja koostöös suure subühikuga osaleb 30S translokatsioonil ehk mRNA ja tRNA-de ühe koodoni kaupa edasiliigutamisel läbi ribosoomi (Carter jt., 2000).

1.2. Ribosoomi 50S subühik

Ribosoomi suur subühik koosneb kahest rRNA molekulist ja rohkem kui 30 r-valgust. 23S rRNA sekundaarstruktuuris eristatakse kuut domeeni, mis koos 5S rRNA-ga moodustavad kompaktse läbipõimunud 3D struktuuri (joonis 2A), kus erinevalt 30S subühikust ei saa eristada rRNA tertsiaalstruktuuri põhjal tekkinud domeene (Ban jt., 2000). See kvalitatiivne erinevus peegeldab konformatsioonilist paindlikkust, mis on väiksem 50S subühiku puhul (Ban jt., 2000). *E. coli* 23S rRNA koosneb 2904 nukleotiidist ja 5S rRNA 120 nukleotiidist (Wilson ja Nierhaus, 2005).

50S alaühikus on rohkem kui 30 r-valku, mille tähistus (L ehk *large*) viitab nende paiknemisele suures subühikus. *E. coli* suures subühikus on 33 r-valku – L1 kuni L36 –, kuid seoses täpsustunud teadmistega erinevatest r-valkudest ei kasutata enam nimetusi L8 ega L26 ning L7/L12 viitab samale, ainult N-atsetüleerituse poolest erinevale valgule (Stelzl jt., 2001). Sarnaselt 30S subühikule on r-valgud jaotunud ka suures subühikus ebaühtlaselt (joonis 2B), koondudes subühiku solvendipoolsele küljele ning olles vähem esindatud kokkupuutepinnal (Ban jt., 2000).

Suures subühikus eristatakse kolme morfoloogilist tunnust: L1 haru, keskne kühm ja L7/L12 haru (L11 haru). Subühikute kokkupuutepinna poolt vaadates vasakul küljel paiknev L1 haru koosneb 23S rRNA-st ja L1 r-valgust (Nikulin jt., 2003), paremal küljel asuv L7/L12 haru koosneb 23S rRNA-st, sellega seonduvatest r-valkudest L11 ja L10 ning L10-ga interakteeruvatest L7/L12 dimeeridest (*E. coli*'l kaks) (Diaconu jt., 2005). Keskne kühm moodustub 23S ja 5S rRNA-st ning r-valkudest L5, L18, L25 (Willumeit jt., 2001; Zhao jt., 2004) ja L31 (Selmer jt., 2006).



Joonis 2. 50S subühiku vaatega 30S subühiku poolt. (A) 23S sekundaarstruktuuri domeenid (I–VI) on omavahel tertsiaalstruktuuris põimunud ja ei moodusta selgesti eristatavaid üksusi. 5S rRNA on tähistatud tumeroosaga. Joonis kohandatud Ban jt., 2000. (B) 50S subühiku skeem L1 haru, keskse kühmu ja L11 haruga, joonega näidatud peptidüültransferaasne tsenter (PTC). Joonis kohandatud Kaczanowska ja Ryden-Aulin, 2007.

Lisaks nimetatud morfoloogilistele tunnustele asuvad suures subühikus peptidüültransferaasne tsenter (PTC), mis koosneb 23S rRNA-st, ja ligi 100 Å pikkune ja keskmiselt 15 Å laiune tunnel, mille kaudu väljub ribosoomist kasvav peptiid (Nissen jt., 2000). Tunneli enamuses hüdrofiilse seina moodustuvad 23S rRNA ja L4, L22 ja L39e arhes *H. marismortui* (Nissen jt., 2000).

Suure subühiku PTC-s katalüüsitakse kahe aminohappe vahele peptiidside, L7/L12 haru seob translatsioonifaktoreid (Ban jt., 2000) ja L1 haru rolli nähakse deatsüleeritud tRNA vabanemises E-saidist, kuid see ei ole katselist tõendust leidnud (Korostelev jt., 2008). Keskse kühmu funktsioonis ei ole täit selgust, kuid oletatakse selle rolli signaaliülekanal PTC-st translokatsioonil olulisse 23S rRNA domeeni II (Zhao jt., 2004, Dokudovskaya jt., 1996).

1.3. Ribosomaalsete valkude omadused

Ribosoomi valke defineeritakse nende koopiaarvu kaudu: ribosoomi valgud on esindatud ribosoomis ühe koopiaga, samas kui translatsioonifaktorite koopiaarv ribosoomi kohta on väiksem kui üks (Stelzl jt., 2001; Wilson ja Nierhaus, 2005). See definitsioon lähtub eeldusest, et ribosoomid on eri kasvufaasis ja keskkonnatingimustel samasuguse r-valgulise koostisega, mis – nagu mitmed tööd on näidanud (Kaberina jt., 2009; Tammsalu, 2012) – ei pea alati paika.

Kõik r-valgud on ribosoomis esindatud ühes eksemplaris, v.a L7/L12, mille *E. coli* puhul kaks dimeeri moodustavad koos L10-ga pentameerse kompleksi (Wilson ja Nierhaus, 2005). Algselt ei olnud teada L10 ja (L7/L12)₄ koosneva pentameeri olemasolu, mistõttu peeti neid üheks valguks nimega L8, ega ka see, et S20 ja L26 primaarjärjestus on sama, mistõttu loobuti nimetusest L26 (Wilson ja Nierhaus, 2005).

Enamik r-valke koosneb vähem kui 300 aminohappest ja on aluseliste omadustega (keskmine pI ~ 10,1) (Wilson ja Nierhaus, 2005), mis on kooskõlas nende funktsiooniga ribosoomis – negatiivse laenguga rRNA fosfaatselgroo stabiliseerimine. Osade r-valkude (S1, S6, L7/L12) happelisust seletab see, et nad kontakteeruvad pigem teiste r-valkude kui rRNA-ga (Wilson ja Nierhaus, 2005).

Subühikute kristallstruktuuridelt (joonis 1B ja 2B) on näha, et r-valgud paiknevad eelistatult ribosoomi solvendipoolses piirkonnas. Tüüpiliselt saab nende tertsiaalstruktuuris eristada üht või mitut globulaarset domeeni asukohaga subühiku solvendipoolsel pinnal ja jätket või jätkeid, mis ulatuvad subühiku sisemusse ja stabiliseerivad rRNA tertsiaalstruktuuri (Wimberly jt., 2000; Ban jt., 2000).

1.4. Ribosomaalsed valgud L31 ja L36

E. coli genoomist on tuvastatud kahe bakterispetsiifilise r-valgu L31 ja L36 geeniduplikatsioonid (Makarova jt., 2001). Mõlema puhul on näidatud, et neilt kodeeritavad r-valgud esinevad statsionaarse kasvufaasi ribosoomide koostises, muutes raku ribosoomide populatsiooni heterogeenseks (Tammsalu, 2012).

Ribosoomi valku L31 kodeeritakse geenilt *rpmE* (Dabbs, 1981). Lisaks geenijärjestuse põhjal ennustatud 70 aminohappest koosnevale valgule (7,8 kDa) on *E. coli*'s mass-spektromeetriliste analüüsidega näidatud ka teise, kaheksa aminohappe võrra lühema L31 variandi olemasolu (6,9 kDa) (Arnold ja Reilly, 1999), kusjuures selle variandi N-terminaalne järjestus ühtib L31 primaarstruktuuris määratuga (Brosius, 1978). Seega on tegu eeldatavasti osalise L31 post-translatsioonilise modifitseerimisega (kogu valku rakus ei protsessita), kus valgu karboksüterminusest eemaldatakse kaheksa aminohappe pikkune fragment Arg-Phe-Asn-Ile-Pro-Gly-Ser-Lys (Arnold ja Reilly, 1999). Selle kohtspetsiifilise proteolüüsi võimaliku funktsiooni ja mehhanismi kohta andmed puuduvad (Nesterchuk jt., 2011).

L31 on aluseline valk (pI~9,5), mille primaarstruktuuris esineb 11,4% lüsiini ja 7,1% arginiini (Brosius, 1978; päring portaalist *Ecogene* 3.0). Geenijärjestuse põhjal on ennustatud, et L31 sisaldab tsinki siduvat motiivi (Makarova jt., 2001) ning katseliselt on näidatud, et maltoosi siduva valgu ja L31 liitvalk (MBP-L31) seob ühe ekvivalentühiku Zn^{2+} (Hensley jt., 2011).

L31 identifitseerimine r-valguna ja selle asukoha kindlakstegemine ribosoomi struktuuris osutusid suhteliselt keerukaks ülesandeks – seda L31 väiksuse, aluselisuse ja ribosoomiga nõrgalt seotuse tõttu. L31 avastati (koos L35 ja L36-ga) „alles“ 1986. aastal tänu edasiarendatud geelelektroforeesimeetodile, kus *E. coli* r-valkude lahutamiseks kasutati radikaalivaba ja eriti redutseerivat 2D geelelektroforeesi (RFHR) (*radical free and highly reducing two-dimensional electrophoresis*) (Wada, 1986).

L31 on nimetatud „mõistatuslikuks“ valguks (Eistetter jt., 1999), sest selle tuvastamine eri ribosoomipreparaatsioonides ei ole olnud lihtne. L31 dissotseerub ribosoomist kõrgetel soolakontsentratsioonidel (0,5–1 M NH_4Cl), mida on kasutatud ribosoomide puhastamisel (Eistetter jt., 1999). L31 suhteliselt nõrka seotust ribosoomiga näitab ka fakt, et see r-valk on võimeline vahetuma ribosoomiga seotud ja mitteseotud oleku vahel *in vivo* (Pulk jt., 2010).

L31 on positsioneeritud *T. thermophilus*'e 70S kristallstruktuuril suure subühiku kesksesse kühmu L5 lähedale ning näidatud L31 kontakteerumist S19-ga (Selmer jt., 2006). Need andmed tõstatasid võimaluse L31 osalemisest subühikute vaheliste kontaktide tekkel, mida demonstreeriti mõni aasta hiljem *T. thermophilus*'e 70S kristallstruktuuril korrektse tRNA valikumehhanisme uurides (Jenner jt., 2010). *E. coli* puhul on arvutianalüüside põhjal oletatud, et L31 võiks osaleda silla B1b tekkes, dünaamikas ja stabiliseerimises (Shasmal jt., 2010). Täpsemalt käsitleb seda temaatikat ribosoomide heterogeensuse alapeatükk.

E. coli r-valgu L31 paraloogset valku L31B kodeerib geen *ykgM* (Makarova jt., 2001). Selle geeni ekspressiooni indutseeritakse tsingivaeses keskkonnas (Graham jt., 2009), tegu on Zur repressorist sõltuva protsessiga (Graham jt., 2009; Hemm jt., 2010). L31B molekulmassiga 9,9 kDa koosneb 87 aminohappest (päring portaalist *Ecogene* 3.0). L31B erinevus L31-st seisneb tsinki siduva motiivi puudumises (Makarova jt., 2001; Härd jt., 2000), mistõttu MBP-L31B ei seo seda metalliooni (Hensley jt., 2011).

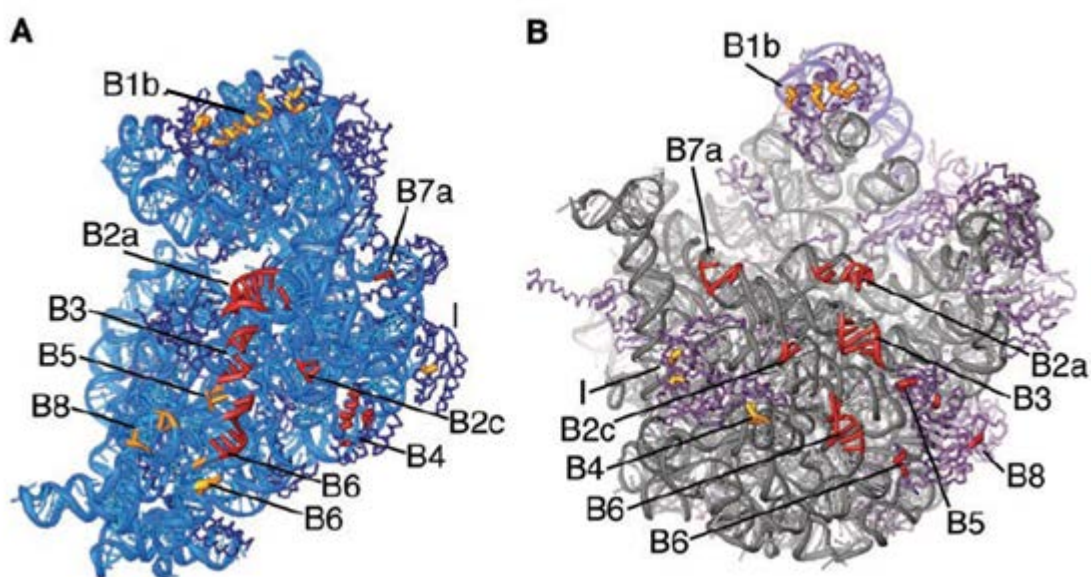
Teine *E. coli* genoomis duplitseerinud geenidega r-valk on L36 (Makarova jt., 2001), mida kodeerib geen *rpmJ* (Wada ja Saku, 1987). Tegemist on kõige väiksema prokariootse r-valguga – molekulmass 4,4 kDa (Arnold ja Reilly, 1999), aminohappeid 38 (päring portaalist *Ecogene* 3.0). L36 on aluseline valk, mille koostises on 18,4% lüsiini ja 13,2% arginiini (päring portaalist *Ecogene* 3.0). L36 struktuur sisaldab histidiinist ja kolmest tsüsteiinist koosnevat tsinki siduvat motiivi (Härd jt., 2000). Keemilise uurimise katsed (*chemical probing*) selles valgu suhtes puuduliku *E. coli* tüvega näitavad, et L36 osaleb 23S rRNA struktuuri organiseerimisel (Maeder ja Draeper, 2005).

L36 paraloogset valku L36B kodeerib *E. coli*'s geen *ykgO* (Hemm jt., 2008), mis kuulub samasse operoni L31B geeniga *ykgM* (Hemm jt., 2010). Seega reguleerib ka *ykgO* transkriptsiooni Zur repressor, mis lahkub operoni regulaatoralalt tsingipuuduses (Hemm jt., 2010). L36 näol on tegemist 46 aminohappelise valguga (Hemm jt., 2008) (5,5 kDa) (päring portaalist *Ecogene* 3.0). L36B ei ekspresseeru kiiresti kasvavates rakkudes rikkal söötmel, seda r-valku sünteesitakse minimaalsöötmel kasvanud rakkudes statsionaarses kasvufaasis (Hemm jt., 2008). Sarnaselt L31B-le ei ennusta L36B geenijärjestus tsinki siduvat motiivi (Makarova jt., 2001).

1.5. Subühikute vahelised sillad. L31 ja sild B1b

Translatsiooni mõistmiseks molekulaarsel tasemel ei piisa ribosoomi alaüksuste või komponentide uurimisest *an sich* – huvi pakub ikkagi „töötav masin“ ehk 70S ribosoom kompleksis mRNA ja tRNA-dega (Frank, 2000). Sellise uurimisperspektiiviga seoses lisanduvad kategooriad, nagu subühikute vahelised sillad, ribosoomi tRNA-d siduvad saidid ja ribosoomi dünaamika translatsioonitsükli ajal.

Prokariotoodi ribosoomi subühikute vahel on identifitseeritud mitmeid kontakte, mis moodustavad 12 silda (Yusupov jt., 2001; Gao jt., 2003, Schuwirth jt., 2005). Sillad liigitatakse vastavalt neid moodustavatele komponentidele rRNA-rRNA, rRNA-valk või valk-valk tüüpi sildadeks (joonis 3). Kõige rohkem kontakte (pooled) tekib rRNA-de vahel, üks sild on r-valgulise koostisega ning ülejäänud on hübriidsillad (Gao jt., 2003). Oluline erinevus sillaklasside vahel on nende paiknemine subühikute kokkupuutepinnal: rRNA-rRNA sillad asuvad pigem tsentraalselt (Gao jt., 2003), olles translatsiooni ajal stabiilsemad kui valgulise komponendiga sillad, mis asuvad perifeersemalt ja läbivad suuremaid konformatsioonilisi muutusi (Zhang jt., 2009).

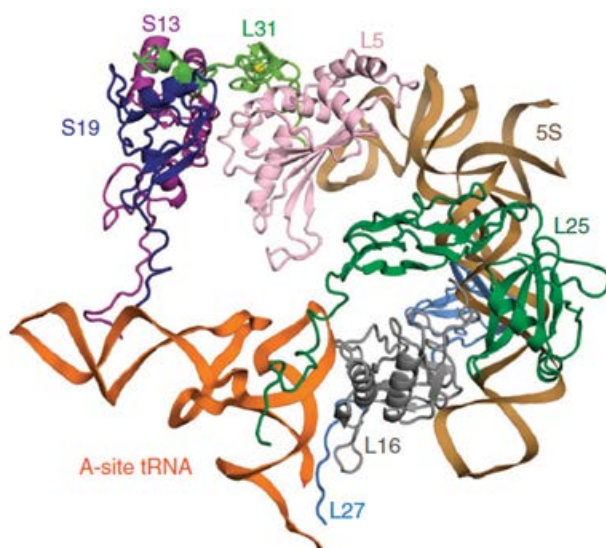


Joonis 3. Ribosoomi subühikute vahelised sillad. (A) 30S subühiku vaade kokkupuutepinna poolt. sinine – rRNA; tumesinine – valgud (B) 50S subühiku vaade kokkupuutepinna poolt. hall – 23S rRNA; heledililla – 5S rRNA; lilla – r-valgud. Sillad on tähistatud nime ja värvikoodiga: kuldne – sillas osaleb teises subühikus valk; punane – sillas osaleb teises subühikus rRNA. Sildu B7b ja B1a pole joonisel näha. Joonis kohandatud artiklist Schuwirth jt., 2005.

Subühikute assotsiatsioonis nende vahele tekkivad sillad on olulised, hoidmaks ribosoomi valgusünteesi ajal koos – ja ometi on translatsiooni seisukohalt väga oluline, et osad sillad oleksid dünaamilisemad. Sildade erinev liikuvus põhineb nende koostisel, kusjuures rRNA on „jäigem“ kui valgud, ja liikuvus on maksimaalne valk-valk tüüpi puhul (Zhang jt., 2009).

Lähtuvalt käesoleva magistritöö temaatikast (L31 bioloogiline funktsioon) keskendub alljärgnev subühikute sildade teemaline käsitus sillale B1b, sest selle koosseisus on *T. thermophilus*'e 70S kristallstruktuuris tuvastatud L31 valk (Jenner jt., 2010).

Sild B1b ühendab 30S subühiku pead 50S subühiku keskse kühmuga (joonis 3) ning moodustub ainukese valk-valk sillana S13 ja L5 vahel (Gao jt., 2003). Alles mõne aasta eest näidati *T. thermophilus*'e 70S kristallstruktuuri põhjal korrektse tRNA valikumehhanisme uurides (Jenner jt., 2010), et sillal B1b osaleb suure subühiku poolt hoopis L31, mis on kontaktis r-valkudega S13, S19 ja L5 ning 5S rRNA-ga (joonis 4). Seniste uuringute põhjal on pakutud välja, et silla B1b olulisus avaldub valgusünteesi elongatsiooni selles etapis, kus ribosoomi A-saiti valitakse korrektset tRNA-d (Jenner jt., 2010), ja translokatsioonil (Gao jt., 2003).



Joonis 4. L31 paiknemine ribosoomi subühikute vahelises sillal B1b ja r-valgud ribosoomi A-saidis oleva korrektse tRNA ümbruses. L31 tsinki siduv motiiv asub N-terminuses (Zn^{2+} tähistatud kollasega), mis kontakteerub L5-ga. L31 C-terminus ulatub 30S subühikusse, kus see kontakteerub S13 ja S19-ga. Joonis pärit Jenner jt., 2010.

Translokatsiooni käigus liigutakse tRNA-sid koos mRNA-ga ribosoomi tRNA-d seondavate saitide vahel suunaga $A \rightarrow P \rightarrow E$, et kindlustada uue aminoatsüleeritud tRNA tulekuks vaba A-sait, samas kui P-saidis on peptidüül-tRNA (Ramakrishnan, 2002). Translokatsioon algab väikese subühiku liikumisega suure suhtes, mille tagajärjel tekivad tRNA-d siduvad hübriidsaidid, kus A-saidi tRNA antikoodonling on 30S subühiku A-saidis ja aktseptorõlg

50S subühiku P-saidis (A/P olek) ning P-saidi tRNA on „nihkunud“ E-saidi poole (P/E olek) (Ramakrishnan, 2002).

Järgmises etapis liigub 30S pea domeen keha suhtes 12–15° (Gao jt., 2003) ning just siin on oluline B1b silla suur liikuvus, mida on erinevate *E. coli* 70S kristallstruktuuride võrdluses hinnatud kuni 20 Å-le (Zhang jt., 2009). Väikese subühiku pea liikumise mõte on oletatavasti säilitada kontakte hübriidolekus tRNA-de ja ribosoomi subühikute vahel (Korostelev jt., 2008). Sild B1b „liigub“ peaga kaasa, aga teine 30S subühiku pead ja 50S subühiku keskset kühmu ühendav sild (B1a) katkeb (Gao jt., 2003).

Lisaks 30S subühiku pea liikuvuse tagamisele (selle äärmiste positsioonide stabiliseerimise kaudu L31 poolt Shasmal jt., 2010) spekuleeritakse, et silla B1b funktsioon avaldub ka korrektse tRNA valikul ribosoomi A-saiti (Jenner jt., 2010). Korrektset antikoodoniga paarduva tRNA (*cognate* tRNA) eristamine ühe mittepaardumisega tRNA-st (mittepaardumine koodoni 1. või 2. positsioonis; *near-cognate* tRNA) algab dekodeerivast tsentrist, kus koodon-antikoodon paardumist kontrollib 16S rRNA, ning jätkub tRNA antikoodonlingu (*stem loop*) ja *elbow*-regiooni tugevama sidumisega S13 ja S19 poolt korrektse tRNA puhul võrreldes mittepaardumistega tRNA-ga (Jenner jt., 2010). Kontakteerudes nii S13 kui S19, aga ka L5 ja 5S rRNA-ga, seisneb bakterite seas konserveerunud L31 roll nii S13 ja S19 vaheliste interaktsioonide reguleerimises kui ka osalemises silla B1b kaudu signaaliüleandes dekodeeriva tsentri ja PTC vahel (Jenner jt., 2010). Autorid püstitavad hüpoteesi, et L31 osaleb korrektse tRNA valikul ribosoomi A-saiti, aidades stabiliseerida korrektse tRNA korral selle seondumist A-saidiga.

Kuigi avastus tehti *T. thermophilus*'e 70S ribosoomi kristallstruktuuri põhjal, annab üldine suur sarnasus tema ja *E. coli* subühikute vaheliste sildade struktuuris (Gao jt., 2003 vt metoodikat!) põhjuse spekuloida, et r-alk L31 võiks osaleda nimetatud sillal ka *E. coli* puhul. Seda hüpoteesi toetavad *in silico* uuringud, kus *T. thermophilus*'e vaste järgi koostatud L31 mudel sobitus *E. coli* 70S krüo-elektronmikroskoopia struktuuri (Shasmal jt., 2010). Tõestamaks, et L31 osaleb sillal B1b ka *E. coli*'s, oleks tarvis tuvastada see alk vastavates 70S struktuurides. Tulenevalt silla B1b olulisusest translokatsioonil (Gao jt., 2003) ja rollist tRNA valikul (Jenner jt., 2010), tasuks uurida L31 mõju translatsiooni täpsusele ja kiirusele. Arvestades lisaks eelnevalt ka fakte, et *E. coli* L31 geenid on duplitseerinud (Makarova jt., 2001) ja et paralogsed valgud lülituvad ribosoomi sõltuvalt kasvufaasist (Tammsalu, 2012), tasub uurida L31 variantide mõju ribosoomi subühikute assotsiatsioonile.

2. Ribosoomide heterogeensus

Klassikaliselt on ribosoomi peetud muutumatu koostisega ribonukleoproteiinpartikliks, mille kirjeldamisel kasutatakse tihti B. Albertsi eeskujul (1998) molekulaarse masina metafoori. Tõepoolest, ribosoomi eri koostisosad töötavad omavahel koordineeritult kiiresti ja täpselt, dekodeerides mRNA koodonites oleva info ning pannes selle sobivasse aminohappelisse vormi. Seega on masina kui automaatse „töötajaja“ kujund adekvaatne, kirjeldamaks ribosoomi aktiivsust valgusünteesi põhipunktides.

Lisaks on nimetatud metafoor on leidnud tuge sellel sajandil krüoelektronmikroskoopia ja röntgenkristallograafia meetoditega tehtud ribosoomi ning sellega seonduvate, valgusünteesis osalevate molekulaarsete komplekside peenstruktuuridest (nt Jenner jt., 2010), mille eesmärk on näidata „masinat selle töö eri etappides“ (Gilbert 2011). Et uurimisobjektiks on valgusüntees *an sich* – selle peenmehhanismid ja osalevate molekulide atomaarsed struktuurid – , siis on täpsema pildi saamiseks kasutatud defineeritud keskkonnast pärit homogeenset materjali (Gilbert 2011). Nii on tugevnenud ettekujutus ribosoomist kui molekulaarsest masinast, mis viitab sellele, nagu täidaks ribosoom oma funktsiooni ilma reguleerivast panusest.

Ribosoomide heterogeensus all mõistetakse eri koostisega ribosoomide alampopulatsioonide esinemist ühes organismis selle eluea jooksul, kusjuures ribosoomi komponent on määratletud kui molekul, mis on alaliselt seotud täielikult assambleerunud ribosoomiga (Ramagopal, 1992). Ribosoomide mitmekesine struktuurne sisu võib põhimõtteliselt tekkida komponentide kovalentsel modifitseerimisel ja r-valkude stöhhiomeetria muutusel (Ramagopal, 1992), samuti eri geenide produktide lülitumisel ribosoomi (Nanamiya jt., 2004).

Ribosoomide heterogeensususe olulisusele organismi elutegevuses viitab selle nähtuse lai levik: selle esinemist on näidatud nii arhedeel (Lopez-Lopez jt., 2007) kui bakteritel (Nanamiya jt., 2004; Tammsalu 2012) ja eukarüootidel (*S. cerevisiae* Komili jt., 2007; *M. musculus* MacInnes jt., 1973).

Tulenevalt käesoleva magistr töö fookusest *E. coli* ribosoomide heterogeensususele käsitletakse järgnevatel alapeatükkides bakteri ribosoomi RNA ja valgulise koostise variatiivsust: heterogeensususe olemus, geneetilised alused, tekkeviisid ning võimalik bioloogiline funktsioon.

2.1. Heterogeensus rRNA tasemel

Moodustades nii dekodeeriva kui peptidüültransferaasse kui tsentri (Noller jt., 1992), on rRNA ribosoomi funktsioneerimise seisukohalt keskse tähendusega koostisosa. Seega võiksid erinevused rRNA primaarstruktuuris – nii selle nukleotiidses järjestuses kui nukleotiidide modifikatsioonides – põhjustada rRNA erinevat voltumist ning eri järjestusega rRNA-de lülitumine ribosoomi võiks olla aluseks heterogeensete ribosoomide tekkele.

rRNA varieeruva järjestuse geneetiliseks aluseks on seda kodeerivate operonide mitmekesisus, mida on näidatud mitmetel bakteritel, sh *Bacillus subtilis*'el (10 operoni) (Loughney jt., 1983), *Streptomyces coelicolor*'il (6) (Baylis ja Bibb, 1988) ja *E. coli*'l (7) (Nomura jt., 1977). *E. coli* genoomist on tuvastatud seitse rRNA-d kodeerivat *rrn* operoni, mille kodeerivate ja reguleerivate alade järjestuses esineb väikeseid erinevusi (Lindahl ja Zengel, 1986; Shen jt., 1982). Operonide promootoritest ülesvoolu jäävad reguleerivad alad moodustavad eri sekundaarstruktuure ning seovad eri afiinsusega transkriptsioonifaktoreid FIS (aktivaator) ja H-NS (repressor), mistõttu eeldatakse operonide erinevat regulatsiooni (Hillebrand jt., 2005).

Spekulatsioone teemal, et ribosoomid võiksid erineda oma RNA koostise poolest ja et see erinevus võiks olla valgusünteesi seisukohast reguleeriva tähtsusega, avaldati juba 1990ndatel, kui operonide arvu ja kasvukiiruse vahelisi suhteid uurides jõuti järeldusele, et kõigi seitsme *rrn* operoni ekspressiooni ei ole tarvis *E. coli* kiire kasvu tagamiseks (Condon jt., 1993, 1995). Veelgi enam, samade autorite andmetel (1993) ei ole kiire kasvu faasis kõigi operonide transkriptsioon maksimaalsel tasemel, sest mitme mutantse operoni inaktiveerimisel tõusis intaktsete operonide transkriptsioonitase. Need tulemused kummutasid üldaktsepteeritud väite, nagu oleks mitme redundatseks peetava *rrn* operoni olemasolu vajalik, et varustada ribosoomi biogeneesi piisava hulga rRNA-ga (Pace, 1973).

Mitme *rrn* operoni olulisus avaldub muutunud keskkonnatingimustega kohanemisel: katsed *E. coli* kultuuri kasvutemperatuuri (28°C→42°C) ja söötmete muutmisega (minimaalsöötmetelt rikkale söötmele) näitasid, et mida rohkem *rrn* operone on deleteeritud, seda aeglasemalt jõuab *E. coli* kultuur eksponentsiaalsesse kasvufaasi (Condon jt., 1995).

Esimesed otsesed tõendid rRNA suhtes heterogeensete ribosoomide *de novo* sünteesi kohta saadi *Streptomyces coelicolor*'i mudelil, kus näidati erinevatelt *rrn* operonidelt transkribeeritud rRNA eksisteerimist ribosoomides (Kim jt., 2007). *S. coelicolor*'i eri arengujärgude rRNA operonide ekspressiooni ja ribosoomide analüüs näitab, et

arengujärkudes ekspresseeritakse eri rRNA-sid. Arvestades seda ja divergentsete *rrn* operonide säilimist evolutsiooni jooksul tõstatavad autorid küsimuse heterogeensete ribosoomide võimalikust spetsiaalsest funktsioonist (Kim jt., 2007). Senini tõendid selle kohta puuduvad.

Lisaks operonide paljususele suurendavad rRNA järjestuse muutlikkust ka selle post-transkriptsioonilised modifikatsioonid. *E. coli* rRNA-s on tuvastatud kümme pseudouridiini, nelja nukleotiidi 2' hüdroksüüli on metüleeritud, samuti ka 19 lämmastikalust eri positsioonidest modifitseeritud (Decatur ja Fournier, 2002). Võttes arvesse modifitseeritud nukleotiidide esinemist ribosoomi funktsionaalsetes tsentrites, subühikute vahelistes sildades, A-, P- ja E-saitides (Decatur ja Fournier, 2002), on loogiline eeldada rRNA modifikatsioonimustri mõju ribosoomi funktsioonile. Oluline näib just modifikatsioonide koosmõju, sest ühegi üksiku modifikatsiooni mõju translatsioonile pole suudetud näidata (Decatur ja Fournier, 2002) ning ükski neist ei ole elutähtis, nagu näitab *in vitro* transkribeeritud rRNaga (ilma modifikatsioonideta) läbi viidud 50S rekonstruktsioon, mille tulemusena saadi *Thermus aquaticus*'e translatsioonivõimelised subühikud (Khaitovitch jt., 1999).

Samas on näidatud ka 23S rRNA konditsionaalset modifitseerimist makroliidide juuresolekul, mille tulemusena saavutab rakk resistentsuse seda tüüpi antibiootikumidele (Byrgazov jt., 2013). Lisaks on näidatud nn kuumašoki metülatsiooni ehk metüültransferaasi FtsJ aktiivsust kõrgematel temperatuuridel, kuid ei ole teada, kas peale ribosoomi struktuuri stabiliseerimisele mõjutab see modifikatsioon ka selle funktsiooni (Bügl jt., 2007).

E. coli puhul on tõestatud eri *rrn* operonide ekspressioon, *S. coelicolor*'i mudelil rRNA poolest heterogeensete ribosoomide olemasolu organismi eri arengujärkudes. Samas puuduvad senini tõendid rRNA järjestuse poolest varieeruvate ribosoomide funktsiooni spetsialiseerumisest.

Esimene tõestus rRNA pikkuse suhtes heterogeensete ribosoomide spetsiaalsest funktsioonist pärineb tööst *E. coli* mudelil, kus uuriti valgusünteesi jätkumist *mazEF* toksiin-antitoksiin süsteemi toksiini MazF aktiveerimisel stressi tekitavas keskkonnas (Vesper jt., 2011). Varasemalt oli näidatud, et MazF induktsioonil on u 90% valkude süntees blokeeritud, samas kui edasi sünteesitakse enamike rakkude surma esilekutsumiseks vajalikke valke ja üllataval kombel ka vähemuse ellujäämiseks vajalikke valke (Amitai jt., 2009). MazF'i endoribonukleaasse aktiivsuse tulemusena tekib kanoonilisest mRNA-st selle liiderjärjestuseta variant (lmRNA), mille selektiivset translatsiooni viib läbi samuti MazF

aktiivuse tulemusena translatsiooniliselt aktiivsest 70S ribosoomist tekkinud 70S_{Δ43nt} partikkel, mille 16S rRNA 3' otsast on lõigatud 43 nukleotiidi pikkune fragment (Vesper jt., 2011). Valikulise lmRNA-d soosiva valgusünteesi aluseks on kahe kanoonilise translatsiooni initsiatsiooni jaoks vajaliku järjestuse puudumine: MazF'i tõttu ei ole mRNA-s Shine-Dalgarno järjestust ega 16S rRNA-s sellega paarduvat anti-Shine-Dalgarno järjestust.

70S_{Δ43nt} partiklid tekivad *in vivo* samades stressi tekitavates tingimustes, mis kutsuvad esile MazF induktsiooni (Vesper jt., 2011). Fakt, et nn stressi-ribosoomid tekivad küpsetest translatsioonivõimelistest 70S partiklitest, näitab, et rakk on võimeline stressifaktorile (nt oksüdatiivne stress, DNA kahjustused) kiiresti ja efektiivselt reageerima, jättes vahele energiakuluka ribosoomide biogeneesi ja kasutades olemasolevaid funktsionaalseid 70S partikleid.

Ribosoomid võivad erineda rRNA järjestuse, selle modifikatsioonimustri ja rRNA pikkuse poolest – samas on rRNA struktuurse varieeruvuse konkreetset valgusünteesi reguleerivat funktsiooni näidatud ainult MazF'i aktivatsiooni tingimustes liiderjärjestuseta mRNA-de translatsioonil.

2.2. Heterogeensus r-valkude tasemel

Sarnaselt rRNA-le, millel on valgusünteesis küll katalüütiline roll, seostatakse ribosoomide heterogeensus r-valkude suhtes translatsiooni peenregulatsiooniga (*fine tuning*), sh ribosoomi selektiivsusega teatud mRNA-de suhtes (Byrgazov jt., 2013). Ribosoomide struktuursele varieeruvusele annavad aluse r-valkude stöhhiomeetrilised erinevused, post-translatsioonilised modifikatsioonid ja paraloogsed geenid.

Esimesed teated selle kohta, et ribosoomide valguline koosseis ei ole püsiv, vaid sõltub raku kasvukeskkonnast, pärinevad 1970ndatest, kui Deusser ja Wittmann näitasid (1972), et rikkal söötmel kasvatatud rakkudest eraldatud ribosoomides esineb rohkem r-valke S6, L12 ja S21 kui minimaalsöötmel puhul. Kohe tõstatati küsimus erineva r-valgulise koostisega ribosoomide võimaliku bioloogilise funktsiooni kohta (Bickle jt., 1973; Hardy 1973).

Kontrollimaks hüpoteesi, et ribosoomide valguline koostis muutub valgusünteesi eri etappides (Kurland jt., 1969), võrreldi polüsoomide, monosoomide, ilma mRNA ning t-RNA-ta ribosoomide ja vabade subühikute r-valgulist koostist denatureerival polüakrüülamiidgeelil (Bickle jt., 1973). Kuigi näidati mõlema subühiku valgulise koostise heterogeensusi eri tüüpi

ribosoomides, seostati ainult 50S struktuurset heterogeensust ribosoomi funktsionaalsusega: L2 puudus vabades subühikutes, samas kui L20 esines ainult translatsiooniliselt aktiivsetes ribosoomides (Bickle jt., 1973). 30S koostis varieerus sarnaste järelduste tegemiseks liialt palju. Siiski jäi struktuurse muutlikkuse bioloogiline funktsioon välja selgitamata.

Esimesed tõendid muutunud r-valkude stöhhiomeetriaga ribosoomide spetsiaalse funktsiooni kohta avaldati rohkem kui 40 aastat pärast esmauuringuid selles valdkonnas. Kaberdina ja kolleegid (2009) demonstreerisid vähenenud r-valkudega 61S partiklite teket *in vivo* antibiootikumi kasugamütsiini mõjul. Veelgi enam, 61S ribosoomid, milles puudusid S1, S2, S6, S12, S18 ja S21, transleerisid kasugamütsiini tingimustes selektiivselt liiderjärjestuseta mRNA-d. Lisaks näidati, et 61S partiklid tekivad 70S ribosoomidest *in vitro*, kui neid inkubeerida kasugamütsiini ja liiderjärjestuseta mRNA juuresolekul.

Selektiivse translatsiooni põhjenduseks esitatud mudel kohaselt on kasugamütsiini seondumiskoht ribosoomis osaliselt sama mis kanoonilise mRNA puhul, mistõttu saab ainult lmRNA ribosoomiga seonduda ja nimetatud r-valkude vabanemist indutseerida (Kaberdina jt., 2009). Kuigi 61S partiklite tekke kohta esitatud mudeli põhjal ei ole selge, mis translatsiooni etapis nimetatud r-valgud ribosoomist lahkuvad ja kas kasugamütsiin jääb ribosoomiga seotuks kogu translatsioonitsükli ajaks, on tegu esimese tõestusega ribosoomide heterogeensuse funktsionaalsuse kohta.

Lisaks r-valkude stöhhiomeetria muutustele võib ribosoomide heterogeensust põhjustada ka erinevalt modifitseeritud r-valkude lülitamine ribosoomi. *E. coli*'is modifitseeritakse translatsioonijärgselt mitmeid r-valke: rohkem kui pooltel r-valkudel eemaldatakse aminotermiinusest metioniin, 6 r-valku metüleeritakse, 3 r-valku atsetüleeritakse ning S12 Asp88-le lisatakse metüüloesterrühm (Nesterchuk, jt., 2011). Kahe r-valgu aminohappeline pikkus muutub, kui nende karboksütermiinusest eemaldatakse kaheksa aminohapet (L31) või sinna lisatakse kuni neli glutamiinhapet (S6) (Nesterchuk, jt., 2011).

Vaatamata r-valkude modifikatsioonide laiale levikule ei ole nende võimalikku teisenenud funktsionaalsust ribosoomi koosseisus piisavalt uuritud, mistõttu konkreetsed näited post-translatsiooniliselt modifitseeritud r-valgule mõjust translatsiooni regulatsioonile puuduvad (Nesterchuk, jt., 2011). Siiski eeldatakse, et ka sellist tüüpi ribosoomide heterogeensuse mõte on suurendada ribosoomide aktiivsust ja selektiivset translatsiooni erinevates kasvukeskkondades (Byrgazov jt., 2013).

Kolmas võimalus ribosoomide r-valgulise heterogeensuse suurendamiseks on osade r-valkude paraloogsed variandid. Bioinformaatiliste analüüsidega ennustati täielikult sekveneeritud bakterite genoomidest võimalikke r-valke kodeerivaid duplitseerinud geene (Makarova jt., 2001). Nelja r-valgu – L31, L33, L36 ja S14 – geenid on duplitseerinud rohkem kui ühes bakteri genoomis ja kuue r-valgu – L11, L28, L7/L12, S1, S15, S18 – paraloogseid geene leiti ainult ühest bakteri genoomist. Tüüpilisel juhtumil kodeerib üks paraloogsetest geenidest nelja konserveerunud tsüsteiini (mõnel juhul asendatud histidiiniga) sisaldava motiiviga (CxxC-motiiv) valku (C+), mis eeldatavasti seob Zn^{2+} . Teise paraloogse geeni produktis puudub eeldatavasti vastav motiiv (C-), mistõttu see ei saavat tsinki siduda (Makarova jt., 2001). Tuginedes tsinkiooni siduva motiivi levikule evolutsiooniliselt kaugete bakterite r-valkudes, peavad autorid CxxC-motiiviga valguvarianti ürgsemaks.

Märkimisväärne on, et ühe erandiga (S14) kodeerivad kõik rohkem kui ühes bakteri genoomis duplitseerinud r-valgu geenid vaid bakteri ribosoomile iseloomulikke r-valke (Makarova jt., 2001). Autorid spekulatsioonivad, et r-valkude paraloogidel võib olla lisaks ribosoomiga seondumisele ka ribosoomiväliseid funktsioone.

Duplitseerinud r-valkude geeni regulatsioonis võib olulist rolli mängida transkriptsiooni repressor Zur, sest C- valkude geenidest ülesvoolu paiknevas alas leiti *in silico* analüüsides Zur'i võimalik seondumiskoht (Panina jt., 2003). Seega võidakse selle paraloogi transkriptsiooni indutseerida Zur'i derepressioonil Zn^{2+} puuduses. Autorite esitatud skeem tsiingi ja Zur'i reguleerivast mõjust r-valkude duplitseerinud geenidele, mis kodeerivad C-valke, sisaldab otseseid viiteid ribosoomide võimalikule heterogeensusele, mille olulisus võiks seisneda Zn^{2+} vabanemises paraloogsetest C+ r-valkudest (Panina jt., 2003).

Bioinformaatilistes töodes tehtud ennustuste paikapidavust paraloogsete r-valkude geenide regulatsiooni ja valkude omaduste kohta uuriti esmalt Gram-positiivse *Bacillus subtilis* mudelil. *Bacillus subtilis* genoomis on duplitseerinud kolme r-valgu geenid ning nende kodeeritud valgud – S14, L31 ja L33 – esinevad kahel esimesel juhul C+ ja C- vormis (Makarova jt., 2001). Lisaks on *in silico* analüüsides ennustatud C- variantide transkriptsiooni regulatsiooni Zur repressori kaudu (Panina jt., 2003).

Nanamiya ja kolleegide katsed (2004) on näidanud nende ennustuste tõepärasust L31 paraloogide puhul: RpmE (C+) seob ühe ekvivalentühiku Zn^{2+} ioone, Zur repressor takistab ytiA transkriptsiooni Zn^{2+} külluses. Lisaks demonstreeriti paraloogide erinevat esindatust eksponentsiaalse ja statsionaarse faasi rakkudest eraldatud ribosoomides, mis näitab nende heterogeensust ja ühtlasi viitab valguvahetusele *in vivo*.

Valguvahetus ehk ühe paraloogi asendumine teisega (RpmE asemele YtiA) võib põhimõtteliselt toimuda nii subühikute assambleerumisel (katselised tõendid puuduvad), kui RpmE asemel võidakse alaüksusesse lülitatada YtiA, mille geenilt algas Zn^{2+} puuduse tingimustes transkriptsioon. Teise võimalusena võib valguvahetus toimuda olemasolevates 70S ribosoomides, sest YtiA on RpmE-st ribosoomi suhtes afiinsem ja võimeline seda ribosoomist välja tõrjuma (Akanuma jt., 2006).

L31 paraloogide asendumise füsioloogilist olulisust nähakse ennekõike panustamisel Zn^{2+} homöostaasi tagamisesse selle iooni vähesuse tingimustes tänu ribosoomist lahkunud RpmE võimalikul lagundamisel sellest vabanevale tsingile (Nanamiya ja Kawamura, 2010). See mõttekäik, mis vajab veel eksperimentaalset tõestust, illustreerib varasemat oletust, et nende funktsioon ei pruugi olla otseselt ribosoomi ega translatsiooniga seotud (Makarova jt., 2001).

Samuti on püstitatud hüpotees, et YtiA seondumine ribosoomiga aitab säilitada selle struktuuri ja translatsioonilist aktiivsust tsink-limiteerivas keskkonnas (Nanamiya ja Kawamura 2010). Seega nähakse L31 variantide funktsiooni nii normaalse füsioloogilise keskkonna taastamises (Zn^{2+} kontsentratsioon) osalemisel kui ribosoomi valgusünteesivõime *status quo* säilitamises muutunud keskkonnatingimustel. Välistada ei saa ka seda, et muutunud L31 valgulise koostisega ribosoomidel võiks olla mingi neile iseloomulik funktsioon.

R-valkude paralooge on uuritud ka S14 näitel, kus on demonstreeritud ribosoomide heterogeensust tsink-limiteerivas keskkonnas (Natori jt., 2007). Lisaks näidati, et YhzA (C-) on võimeline mutantse RpsN (C+) korral osaliselt täitma selle funktsiooni 30S subühiku assambleerimisel ja alaüksuste assotsiatsioonil (Natori jt., 2007). Erinevalt L31 juhtumist, kus valguvahetus võib toimuda 70S ribosoomis (Akanuma jt., 2006) arvatakse S14 puhul selle C-variandi aeglasema ilmumise tõttu ribosoomi, et see lülitub pigem 30S subühikusse selle biogeneesil.

E. coli genoomist on tuvastatud r-valkude duplitseerunud geene, mis kodeerivad L31 ja L36 variante (Makarova jt., 2001). Analoogselt *B. subtilis*'e näitega esineb ka siin dihhotoomiline jaotus vastavalt tsinki siduva motiivi olemasolule: L31 puhul RpmE (C+) ja YkgM (C-) ning L36 korral RpmJ (C+) ning YkgM (C-).

Ribosoomide heterogeensust paraloogsete r-valkude osas on näidatud L31 puhul, kui statsionaarse faasi ribosoomidest identifitseeriti mass-spektromeetriliste analüüsidega nii RpmE kui YkgM (Tammsalu, 2012). Samamoodi nagu *B. subtilis*'e mudelil saab mitmekesise

L31 koostisega ribosoomide populatsioon saab tekkida olemasolevatest ribosoomidest valguvahetuse kaudu *in vivo*: RpmE kontsentratsioon langes statsionaarse faasi 70S partiklites oluliselt, samal ajal kui YkgM kontsentratsioon neis tõusis (Tammsalu, 2012). Täpsemad katsed *rpmE* deletsioonitüvega näitasid, et YkgM seondub ribosoomiga juba logaritmilises kasvufaasis piisava Zn^{2+} juuresolekul, mistõttu võib eeldada osalist funktsionaalset kattuvust paraloogsete L31 valkude vahel (Tammsalu, 2012). Lisaks järeldati, et *ykgM* transkriptsiooni regulatsiooniks on ka teisi võimalusi peale Zn^{2+} -st sõltuva repressiooni, millele on senini *B. subtilis*'e r-valkude paraloogide uuringutel keskendutud.

E. coli ribosoomid võivad olla heterogeensed ka L36 paraloogsete valkude suhtes, sest mass-spektromeetriliste analüüsid näitasid YkgO seondumist statsionaarse faasi ribosoomidele, kuigi võrreldes YkgM-iga hiljem ja väiksemas hulgas (Tammsalu, 2012). Huvitav on, et erinevalt L31-st puudub korrelatsioon RpmJ kontsentratsiooni vähenemise ja YkgO kontsentratsiooni suurenemise vahel (Tammsalu, 2012), mis viitab sellele, et analoogselt *B. subtilis*'e S14-le seondub YkgO pigem subühikute assambleerimisel, mitte ei tõrju RpmJ valku ribosoomist välja. Vastavad *in vitro* katsed L31 ja L36 paraloogide afiinsuse väljaselgitamiseks ribosoomi suhtes, samuti nn „tõrjumiskatsed“ tooksid neisse oletustesse selgust.

Ribosoomide r-valgulist heterogeensust on näidatud kui varieeruvust teatud r-valkude stöhhioomeetrias ja ribosoomiga seotud paraloogsetes r-valkudes. Heterogeensed ribosoomid, mille distinktiivne funktsioon ilmneb senistel andmetel liiderjärjestuseta mRNA-de selektiivsel translatsioonil, tekivad *E. coli*'s kasugamütsiini olemasolul (Kaberina jt., 2009). Struktuurselt varieeruvate ribosoomide funktsioon statsionaarses kasvufaasis on veel teadmata.

2.3. Ribosoomi filtri hüpotees

Oluline teetähis ribosoomide heterogeensusele bioloogilise funktsiooni otsimisel on Mauro ja Edelmani avaldatud ribosoomi filtri hüpotees (2002), mille kohaselt võib eukarüootne ribosoom mängida olulist rolli geeniekspressiooni regulatsioonil translatsiooni initsiatsiooni tasemel. Nimetatud hüpotees tõstatab võimaluse, et struktuurselt erinevad ribosoomid on võimelised mRNA-sid „filtreerima“ ehk nende hulgast selektiivselt transleerima teatud mRNA-sid, võimendades sellega nende geenide avaldumist.

Kuigi ribosoomi filtri hüpotees on esitatud eukariootse translatsiooni seisukohalt, sisaldab see ka bakteri ribosoomide heterogeensuse funktsionaalsuse mõtestamiseks sobivaid üldpõhimõtteid.

1. Lähtudes sellest, et translatsiooni regulatsioon toimub põhiliselt initsiatsiooni tasemel (Malys ja McCarthy, 2011), keskendub ribosoomi filtri hüpotees mRNA ja väikese alaüksuse vahelistele (ehk mRNA : rRNA ja mRNA : r-valgud) interaktsioonidele, mis võivad muutuda sõltuvalt konkreetse mRNA subühikuga seonduvatest järjestustest ja ribosoomi struktuurist (Mauro ja Edelman, 2002).

Bakterite translatsiooni initsiatsioonil on oluline mRNA ja väikese subühiku rRNA vaheline komplementaarsus. mRNA 5' mittetransleeritavas otsas asuva Shine-Dalgarno järjestuse ja 30S subühiku 16S rRNA 3' otsas asuva anti-Shine-Dalgarno (aSD) järjestuse vahel toimub aluspaardumine (Steitz ja Jakes, 1975). Seega, kui muutub väikese subühiku aSD järjestus või selle kättesaadavus (ribosoomide heterogeensus), siis peaks loogiliselt vähenema kanooniliste mRNA-de translatsioon, mida on *E. coli* mudelil edukalt näidatud (Vesper jt., 2011).

Filtri hüpotees ja senised uurimused *E. coli* põhjal on keskendunud ribosoomide heterogeensuse mõjule translatsiooni initsiatsiooni etapile, kuid senini ei ole avaldatud töid selle mõjust elongatsioonile. Kas alternatiivse koostisega ribosoom suudab teatud keskkonnatingimustes transleerida kiiremini ja/ või täpsemini kui kanooniline ribosoom?

2. Ribosoomi mõju konkreetse mRNA translatsioonile võib olla nii seda võimendav kui takistav, sest mRNA-d konkureerivad omavahel ribosoomi väikese subühikuga seondumise pärast ning „võitja“ mRNA translatsioon vähendab paratamatult „kaotanud“ mRNA-de translatsioonitaset (Mauro ja Edelman, 2002).

Ribosoomide heterogeensus 16S rRNA või kuue 30S subühiku r-valgu suhtes annab mRNA-de konkurentsivõimet väikese subühikuga seondumisel selektiivse eelise liiderjärjestuseta mRNA-dele ja vähendab märgatavalt kanooniliste mRNA-de translatsiooni (Vesper jt., 2011; Kaberdina jt., 2009). On näidatud, et stressitingimustes transleeritavad mRNA-d kodeerivad nii enamiku rakkude surmaks ja väheste rakkude ellujäämiseks vajalikke valke (Amitai jt., 2009).

3. Ribosoomi filtrit saab muuta, kui teisenenud koostisega subühikus võib olla muutunud mRNA-ga kontakteeruv sait või selle ligipääsetavus mRNA-le (Mauro ja Edelman, 2002).

MazF endoribonukleas on võimeline katalüüsima translatsioonivõimelise ribosoomi 16S rRNA-s fosfodiesterideme hüdrolyüsi nii, et see kaotab oma aSD järjestuse. Ribosoom hakkab valikuliselt transleerima l-mRNA-sid (Vesper jt., 2011).

Mitmetes töödes on tõstatatud küsimus heterogeensete ribosoomide saatusest pärast nende eristumist esile kutsunud keskkonna tingimuste kadumist (Vesper jt., 2011; Moll ja Engelberg-Kulka, 2012; Byrgazov jt., 2013). Veel ei ole tõendeid selle kohta, kas sellised ribosoomid lagundatakse või hoopis taastatakse nende kanooniline koostis. Ribosoomide reparaatsiooni valguvahetuse kaudu on näidatud (Pulk jt., 2010), kuid selle mehhanismi olulisus heterogeensete ribosoomide kontekstis väärib eraldi uurimist.

Filtri hüpotees ei välista heterogeensuse muid, nn ribosoomiväliseid funktsioone: bakterirakus tsingi kontsentratsiooni tõstmine selle elemendi limitatsioonil (Nanamiya jt., 2004) või ribosoomi termostabiilsuse tõstmine kõrgematel temperatuuridel (Lopez-Lopez jt., 2007).

Siiski on rohkem tähelepanu pälvinud ribosoomi võimalik roll translatsiooni regulatsioonis ning filtri hüpoteesi põhjal on hakatud uurima nn spetsialiseerunud ribosoomide temaatikat eelkõige eukaryootsetel mudelorganismidel (Gilbert, 2011; Xue ja Barna, 2012). Seal oletatakse spetsialiseerunud ribosoomide olulisust rakkude diferentseerumisel. Kuigi palju võtmetähtsusega küsimusi on veel lahtised, töotavad uuritavate ribosoomide spektri laiendamine ja uuritavates protsessides oluliste valkude mRNA-de täpsem analüüs rohkem teavet alternatiivsete ribosoomide rolli kohta raku- ja arengubioloogias (Xue ja Barna, 2012). Ribosoomide heterogeensusest lähtuv spetsialiseerumine võiks mõjutada translatsiooni nii initsiatsiooni kui elongatsiooni tasemel: esimeses etapis selle efektiivsust (initsiatsiooni edukus) ja selektiivsust (mRNA valik), teises etapis protsessi täpsust (aminoatsüleeritud tRNA valik) ja kiirust (Gilbert, 2011).

Võimalikku ribosoomide spetsialiseerumist on bakteritel senini vähe uuritud ja sedagi ainult stressivastuse kontekstis: kaks tööd *E. coli* põhjal illustreerivad temaatika olulisust raku kohanemisel stressi tekitava keskkonnaga (Vesper jt., 2011; Kaberdina jt., 2009). L31 paraloogete r-valkude võimalikku mõju ribosoomile käsitleb käesolev töö.

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. Töö eesmärk

Selle töö laiem eesmärk on panustada ribosoomi valgu L31 funktsioonide ja selle kaudu ribosoomide heterogeensuse uurimisse *E. coli* mudelil. Lähtuvalt paraloogide esinemisest nimetatud r-valgul *E. coli* ribosoomides (Tammsalu, 2012) on kesksel kohal küsimus nende valgusünteesiga seotud funktsioonidest. Tööhüpoteesi kohaselt moduleerivad r-valkude paraloogid ribosoomi tööd ja on vajalikud bakterirakkude adapteerumiseks stressitingimustes

Eksperimentaalne osa hõlmab nii *in vivo* katseid, kus uurimise all on L31 paraloogide mõju rakkude kasvufenotüübile, kui *in vitro* katseid, mille siht on saada tõendeid L31A ja L31B funktsionaalse erinevuse kohta subühikutevaheliste kontaktide kontekstis. Selline uurimisperspektiivi valik on põhjendatud tõenditega L31 osalemisest *T. thermophilus*'e subühikutevahelises sillast (Jenner jt., 2010) ja viidetega selle kohta *E. coli*'s (Shasmal jt., 2010).

Käesoleva magistritöö eesmärgid on

- 1) analüüsida, kuidas mõjutab L31 paraloogide puudumine rakkude kasvufenotüüpi,
- 2) puhastada L31 paralooge biokeemilisteks katseteks,
- 3) analüüsida L31 rolli 70S ribosoomi moodustumisel *in vivo* ja *in vitro*

2. Materjal ja metoodika

2.1. Bakteritüved ja plasmiidid

Magistritöö eksperimentaalses osas kasutatud *Escherichia coli* tüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1 ja oligonukleotiidid tabelis 2.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide allikale
MG1655	<i>F' lambda⁻ ilvG⁻ rfb-50 rph-1</i>	Blattner jt., 1997
MG1655 <i>ΔrpmE::kan</i> ehk <i>ΔL31A</i>	Keio kollektsoonist pärit <i>ΔrpmE::kan</i> transduktsiooni teel üle viidud tüvesse MG1655	Kai Virumäe
MG1655 <i>ΔykgM::kan</i> ehk <i>ΔL31B</i>	Keio kollektsoonist pärit <i>ΔykgM::kan</i> transduktsiooni teel üle viidud tüvesse MG1655	Kai Virumäe
MG1655 <i>ΔrpmEΔykgM::kan</i> <i>ΔL31AB</i>	<i>ΔykgM::kan</i> transduktsiooni teel üle viidud tüvesse MG1655 <i>ΔrpmE::kan</i>	Aivar Liiv
MRE600	<i>ΔrnaI</i>	laborikollektsoon
TOP10	<i>F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG></i>	life technologies
Plasmiidid		
pGEX-4T-1-TEV	retsipientplasmiid L31A ja L31B üleekspressioonivektorite tegemiseks	Juhan Sedman
pGEX- <i>rpmE</i>	GST-L31A üleekspressiooniplasmiid	käesolev töö
pGEX- <i>ykgM</i>	GST-L31B üleekspressiooniplasmiid	käesolev töö
pBAD- <i>rpmE</i>	plasmiidil pBAD/Myc-HisC (Invitrogen) põhinev L31A üleekspressiooniplasmiid	Aivar Liiv
pBAD- <i>ykgM</i>	plasmiidil pBAD/Myc-HisC (Invitrogen) põhinev L31B üleekspressiooniplasmiid	Aivar Liiv

pBAD- <i>rpmE-ykgM</i>	plasmiidil pBAD/ <i>Myc-HisC</i> (Invitrogen) põhinev L31A ja L31B üleekspressiooniplasmiid	Aivar Liiv
------------------------	--	------------

Tabel 2. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Nimetus	Järjestus	Kasutamine
L31A-DIR-BamHI	AGT CCGGA TCCAT GAAAAA GATA TTCA CCC GAAA TAC	pGEX- <i>rpmE</i> konstrueerimine
L31A-REV-XhoI	AGT CCC TCGAG TTA TTTGCT GCCC GGGA TGTTGA	pGEX- <i>rpmE</i> konstrueerimine
L31B-DIR- BamHI	AGT CCGGA TCCA TGAA GCCC AATA TCCA TCCT GAG	pGEX- <i>ykgM</i> konstrueerimine
L31B-REV-XhoI	AGT CCCT CGAG TCA CG CCCCC TTTT CGT GCT AAC	pGEX- <i>ykgM</i> konstrueerimine
pGEX-GST-DIR	ACCCA TCCT GAC TTC ATG TTG	pGEX konstruktide kontrollimine koloonia PCR- iga
pGEX-AMP-REV	GGGAAT AAGGG CGA CA CGGA	pGEX konstruktide kontrollimine koloonia PCR- iga

2.2. Söötmed

LB (algelt *lysogeny broth*, kuid lühend kasutusel kui *Luria broth*, *Lennox broth* ja *Luria-Bertani medium*) söödet (Bertani, 2004) – 1% trüptooni, 0,5% pärmiekstrakti, 0,5% NaCl, 1,5% agarit (Bertani, 1951) – kasutati *E. coli* tüvede kasvatamisel säilituskultuurist.

2xYT (*Yeast Extract Tryptone*) söödet – 1,6% trüptooni, 1% pärmiekstrakti, 0,5% NaCl (Sambrook ja Russell, 2001) – kasutati *E. coli* rakkude kasvatamiseks, et neist ribosoomide või üleekspresseeritud r-valku L31A või L31B eraldada. Samas söötmes kasvasid *E. coli* rakud ka kasvukõverate mõõtmise katses.

Söötmetele lisati vastavalt bakteritüve resistentsusele kanamütsiini (Km, lõppkontsentratsioon LB tardsöötmes 50 µg/ml või 2xYT vedelsöötmes 25 µg/ml) ja sõltuvalt plasmidi olemasolust ampitsilliini (Amp, lõppkontsentratsioon 200 µg/ml või 100 µg/ml).

2.3. Generatsiooniaja määramine

Väljakülvid tehti LB tardsöötmele, millele oli lisatud deletsioonitüvede puhul kanamütsiini (lõppkontsentratsioon 50 µg/ml) ja pBADi sisaldavate tüvede puhul ampitsilliini (200 µg/ml). Petri tasse inkubeeriti 37°C juures (Sanyo Incubator). Kaks kolooniat inokuleeriti vastavalt bakteritüve antibiootikumiresistentsusele vedelsöötmesse 2xYT+Amp (100 µg/ml) või 2xYT+Kan (25 µg/ml) ruumalaga 2 ml ning kasvatati öö läbi loksutil (180 rpm, 37°C, INFORS HT Multitron). Üleöökultuurist valmistati 100-kordne lahjendus samasse vedelsöötmesse ruumalaga 1 ml, millest omakorda tehti kaks 20-kordset lahjendust 2xYT söötmesse (mõlemad ruumalaga 1 ml), kusjuures ühele lahjendusele lisati plasmiidilt pBAD L31 paralooget geeni transkriptsiooni indutseerimiseks arabinoosi (0,1%). Mõlemast 20-kordsest lahjendusest pipeteeriti kahte mikrotiiterplaadi kannu 100 µl ning inkubeeriti 17 tundi 37°C juures mikrotiiterplaadilugejas (BMG polarstar), mis mõõtis iga 7 minuti järel bakterikultuuri optilist tihedust A_{600} juures. Generatsiooniaja määramiseks lahutati mõõtmistulemustest foon (ilma bakteriteta söötme mõõtmistulemuste keskmine), logaritmiti tulemusi alusel 2 ning saadud graafikute lineaarse osa tõusu pöördväärtus on pooldumisaeg.

2.4. L31A ja L31B üleekspressiooniplasmiidide konstrueerimine

Transformatsioon ja pGEX-4T-1-TEV paljundamine *E. coli* TOP10 rakkudes. Kompetentseid TOP10 rakke segati kokku 100 ng pGEX-4T-1-TEV plasmiidiga ning inkubeeriti jääl 30 minutit. Järgnes 1,5 minutine kuumašokk (42°C) termoblokil (AccuBlock Digital Dry Bath), pärast mida hoiti rakke 5 minutit jääl. Rakud külvati LB+Amp (lõppkontsentratsioon 200 µg/ml) tardsöötmele ning inkubeeriti kuumakapis üle öö. Üks

koloonia inokuleeriti 30 ml 2xYT+Amp (lõppkontsentratsioon 100 µg/ml) vedelsöötmesse ning kasvatati loksutis 37°C juures üle öö.

Plasmiidse DNA eraldamine ja kontroll. Plasmiidne DNA eraldati vastavalt *Invisorb Plasmid Midi Kit*'i protokollile ja selle kontsentratsiooni mõõdeti NanoDrop'iga. Eraldatud plasmiidide identsust pGEX-4T-1-TEV-ga kontrolliti restriksiooniensüümidega BamHI ja XhoI (mõlemad *Fermentas*). Reaktsioonisegu (15 µl) sisaldas 0,68 µg pDNA-d, 5U vastavat restriksiooniensüümi, 1x ensüümipuhvrit Buffer R (*Fermentas*) ja lõppruumalani Milli-Q (MQ) vett. Reaktsioonisegu inkubeeriti 1 tund 37°C juures ning restrikteeritud produkte analüüsiti 1% agarosigeelil 1xTBE puhvris (90 mM Tris, 90 mM boorhape, 1 mM EDTA).

***E. coli* geenide *rpmE* ja *ykgM* amplifikatsioon.** PCR-i reaktsioonisegu (95 µl) sisaldas 1 µg MG1655 kromosomaalset DNA-d, 10 µl 10x ensüümipuhvrit (750 mM Tris (pH 8,8), 200 mM NH₂SO₄, 0,1% TX-100, 5% ficoll 400, 10 mM tartasiin), 0,2 mM dNTP-d, 2,5 mM MgCl₂, 50 pmol DIR-praimereid, 50 pmol REV-praimereid, 25U Pfu DNA polümeraasi (TÜMRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetool). Termotsükler (Biometra Uno II) töötas pärast I etappi (3 min, 93°C) järgmise 32-tsüklilise programmi alusel: 30 s, 93°C; 40 s, 55°C; 1 min, 72°C; 7 min, 72°C.

PCRi produktide eraldamine ja restriksioon BamHI ja XhoI-ga. PCRi reaktsioonisegud (á 95 µl) lahutati 2% agarosgeelelektroforeesil (MetaPhorTM) TBE puhvris ja fragmendid eraldati geelist vastavalt *Fermentas GeneJET Gel Extraction Kit*'i juhendile. PCR-i produktide kontsentratsiooni mõõdeti NanoDrop'iga.

Puhastatud PCRi produkte ja plasmiidi pGEX-4T-1-TEV restrikteeriti enüümiga BamHI. Reaktsioonisegu (100 µl) koostis: 200 ng PCR produkte või 6,8 µg plasmiidi pGEX, 10 µl 10xP puhvrit, 50U BamHI-d, MQ vett kuni nõutud ruumalani. Restriksioon toimus kaks tundi 37°C juures. Restriksioonisegust puhastati PCR-i produktid vastavalt *Spin PCRapace & MSB Vario Clean Up* protokollile. Plasmiidne DNA lahutati 0,8% agarosgeelil ning puhastati nagu PCR-i produktid. Restriksioonisegu XhoI-ga (50 µl; 37°C) sisaldas 4 µg eelmises punktis puhastatud DNA-d, 5 µl 10x ensüümipuhvrit TangoTM ja 20U restriктаasi XhoI. Restriksioonisegust puhastati *Spin PCRapace & MSB Vario Clean Up*'i protokoll järgi PCRi produktid. Restriksioonisegu pGEX-4T-1-TEV-ga lahutati 0,8% agarosgeelil TBE puhvris ja puhastati sama protokoll järgi nagu PCRi produktid.

Ligatsioon. Plasmiid pGEX-4T-1-TEV ja PCRi produktid *rpmE* või *ykgM* ligeeriti. Ligatsioonisegu (25 µl) koosnes järgnevatest komponentidest: 2 µg pGEX-4T-1-TEV, 2 µg

PCR produkti (*rpmE* või *ykgM*), 2,5 µl 10x T4 ligaasipuhvrit (*Fermentas*) ja 2,5 µl 25 mM heksamiin-koobalt(III)kloriid, 4 µl MQ-d, 5U T4 ligaasi (*Thermo Scientific*). Ligatsioon kestis toatemperatuuril 60 minutit.

Transformatsioon plasmiididega pGEX-*rpmE* ja pGEX-*ykgM*. *E. coli* TOP 10 rakud jääl segati kokku 12,5 µl pGEX-*ykgM* või pGEX-*rpmE* ligatsiooniseguga ning inkubeeriti jääl 30 minutit. Järgnes 40 sekundi pikkune kuumašokk (42°C) termoblokil, pärast mida hoiti rakke 5 minutit jääl. Rakkudele lisati 1 ml 2xYT söödet ja inkubeeriti neid 1 tund (37°C) kuumakapis. Rakukultuuri tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga (4000 rpm, 4°C), ligi pool supernatandist eemaldati. Väljakülv tehti LB+Amp (200 µg/ml) tardsöötmele, mida inkubeeriti üle öö (37°C).

Koloonia PCR. Ligatsiooni efektiivsust kontrolliti koloonia PCR-iga. Tassidelt valiti 5 hästi eristunud kolooniat, mille rakud pandi koos 10 µl MQ-ga 10 minutiks termotsüklerisse (95°C). Lüüsunud rakkudele lisati 15 µl mastermixi: 2,5 µl 10x ensüümipuhvrit (750 mM Tris (pH 8,8), 200 mM NH₂SO₄, 0,1% TX-100, 5% ficoll 400, 10 mM tartasiin), 2,5 µl 25 mM MgCl₂, 10 pmol mõlemat praimerit (GEX-DIR, GEX-REV), 0,5 µl 10 mM dNTP-d, 6,5 µl MQ-d ja 5U Taq DNA polümeraasi (TÜMRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetool). Termotsükler töötas pärast I etappi (3 min, 93°C) järgmise 32-tsüklilise programmi alusel: 30 s, 93°C; 40 s, 55°C; 1 min, 72°C; 7 min, 72°C. PCRi produktid (proov 7 µl) lahutati 1% agarosgeelis TBE puhvris ja valiti välja kolooniad, mille rakke inokuleeriti 2ml 2xYT+ 0,2 mg Amp söötmesse ja kasvatati loksutil öö läbi. Üleööökultuurist eraldati plasmiid pGEX-*rpmE* või pGEX-*ykgM*, jälgides *FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit*'i juhiseid. Konstrukte kontrolliti sekveneerimisega.

2.5. Valkude L31A ja L31B ekspressioon ja puhastamine

***E. coli* rakkude kasvatamine.** Plasmiididega pGEX-*rpmE* või pGEX-*ykgM* transformeeritud TOP10 rakud külvati LB+Amp (lõppkontsentratsioon 200 µg/ml) tardsöötmele ning inkubeeriti üle öö kuumakapis. Üks koloonia inokuleeriti vedelsöötmesse 2xYT+Amp (100 µg/ml) ruumalaga 20 ml ning kasvatati öö läbi loksutil (180 rpm, 37°C). Üleööökultuurist valmistati lahjendus ($A_{600nm} \sim 0,05$) samasse vedelsöötmesse (2x750 ml) ning kasvatati kultuuri kuni varajase logaritmilise kasvufaasini ($A_{600nm} \sim 0,45$). Kogu valgupuhastusprotseduuri jälgimiseks SDS geelelektroforeesil võeti erinevates etappides

kontrollproove. Esimese proovi (1 ml) rakud koguti lauatsentrifuugis Heraeus Biofuge fresco (13000 *rpm*, 3min).

Vedelkultuurile lisati IPTG-d (lõppkontsentratsioon 1mM), et indutseerida plasmiidilt pGEX-*rpmE* või pGEX-*ykgM* vastavate liitvalkude GST-L31A või GST-L31B geenide transkriptsiooni. Induktsioon loksutil (180 *rpm*, 37°C) kestis neli tundi ning selle lõpus võeti kontrollproov (1 ml), mida töödeldi samamoodi nagu enne indutseerimist võetud proovi. *E. coli* rakud koguti lauatsentrifuugis Hettich Rotina 420R (4500 *rpm*, 20 min, 4°C), neid pesti 40 ml-s LBM-150 puhvris (20 mM Tris (pH=7,5), 1 mM EDTA, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 10 mM β-merkaptotetanool), tsentrifuugiti samadel tingimustel.

Rakulüsaadi valmistamine. *E. coli* rakumass suspendeeriti 30 ml-s LBM-150-s, lisati ensüümid DNaseI (*Amresco*, lõppkontsentratsioon 50 U/ml) ja lüsotsüüm (*AppliChem*, lõppkontsentratsioon 2 mg/ml) ning segati rotaatoril Intelli-mixer RM-2 30 minutit (4°C). Rakkude lüüsimise hõlbustamiseks lisati Triton X-100 (0,1%), rakud lüüsiiti pressiga (Stansted SPCH-10 pressure cell homogeniser, silindri maht 10 ml, 100 MPa). Lüsaat klaariti 30 minuti jooksul ultratsentrifuugiga Beckman Coulter Optima L-90K (20000 *rpm*, 4°C, rootor Ti50) ning supernatant filtreeriti läbi 0,45 µm poori suurusega Filtropur S filtri. Seejärel võeti kontrollproov (50 µl).

Liitvalgu GST-L31A või GST-L31B puhastamine aafiinsuskromatograafia abil. L31 puhastamisel kasutati aafiinsuskromatograafiakoloni *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (*GE Healthcare Life Sciences*) (15 ml). ÄKTA *prime plus* töötas järgmise programmi alusel: tasakaalustamine LB-150-ga (50 ml), proovi (50 ml) kandmine kolonnile, pesu LB-150-ga (100 ml), liitvalgu elueerimine LBG-ga (100 ml), fraktsiooni suurus 0,7 ml. Kõik neli etappi toimusid kiirusega 0,3 ml/min.

Nimetatud puhvrite koostis: LB-150 (20 mM Tris (pH=7,5), 1 mM EDTA, 150 mM KCl, 1 mM PMSF, 10 mM β-merkaptotetanool), LBG-100 (20 mM Tris (pH=7,5), 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 1 mM PMSF, 10 mM β-merkaptotetanool, 15 ml redutseeritud glutatioonilahust (30,7 mg/ml glutatiooni puhverdamata 100 mM Tris-is) 150 ml LB-150 kohta).

GST-L31 töötlus TEV proteaasiga. Aafiinsuskromatograafia kromatogrammi alusel valiti edasiseks tööks välja liitvalku GST-L31 sisaldavad fraktsioonid (koguruumala 5,6 ml), võeti kontrollproov (5 µl). Liitvalgulahuse kontsentratsiooni mõõdeti Bradfordi reaktsiooni kaudu: Eppendorf BioPhotometer spektrofotomeetril fooni mõõtmiseks 1500 µl Bradfordi lahust + 50 µl LB-150 ja valgulahuse kontsentratsiooni mõõtmiseks selle viiekordset lahjendust LB-150-s

+ 1500 µl Bradfordi lahust. Seejärel liitvalgulahus kontsentreeriti 10 kDa poori suurusega Amicon Ultra-15 tsentrifugaalfiltri abil (4000 *rcf*, 7 min, 4°C) ning selle ruumala vähenes 5,6 ml-lt 2 ml-le. Valgulahuse kontsentratsiooni mõõdeti Bradfordi meetodiga. Kontsentreeritud liitvalgulahusele (7,5 mg) lisati 0,1 mg TEV proteaasi ning reaktsioonisegu inkubeeriti 16°C juures 3 tundi.

L31 puhastamine geelfiltratsioonikolonnil. Pärast TEV proteaasi katalüüsitud GST–L31A või GST–L31B liitvalgu hüdrolüüsi tõsteti valguproovi KCl kontsentratsiooni 100 mM-lt 150 mM-le. Võeti kontrollproov (5 µl) ja filtreeriti ülejäänud proov läbi 0,2 µm poori suurusega Filtropur S filtri. L31 puhastamise selles etapis kasutati geelfiltratsioonikolonna *Superdex 75 16/60 (GE Healthcare Life Sciences)*, mis on enne proovi pealekandmist tasakaalustatud LB-150 puhvriga. Geelfiltratsioon toimus kiirusega 1,4 ml/min ja fraktsioone koguti 4 ml kaupa.

Kromatogrammi alusel valiti välja valku sisaldavad fraktsioonid, millest võeti kontrollproovid (50 µl). 16% SDS-PAAG tulemuste põhjal valiti fraktsioonid, mida kontsentreeriti 3 kDa Amicon Ultra-15 tsentrifugaalfiltri abil (4000 *rcf*, 40 min, 4°C). Valgulahuste kontsentratsioon oli vahemikus 40-200 pmol/µl.

Tritsiin-SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees. Erinevates L31 puhastamise etappides kogutud kontrollproove analüüsiti vastavalt tritsiin-SDS-PAGE metoodikale (4% kontsentreeriv geel, 10% vahegeel, 16% lahutav geel Schagger, 2006). Kõiki proove, v.a rakke sisaldavaid, võeti 5µl, neile lisati 1,25 µl 5x SDS laadimispuhvrit (*loading dye*). Enne induktsiooni IPTG-ga ja selle lõpus võetud proove tsentrifuugiti 13 000 *rpm*, 2 min, neile lisati 50 µl proovipuhvrit, inkubeeriti termobloki (95°C, 7 min) ja tsentrifuugiti (13 000 *rpm*, 2 min).. Elektroforeesi tingimused olid järgnevad: 10 minutit 30V ja seejärel 60 min, 175V.

L31A ja L31B puhastati sama metoodika alusel. L31A^(Zn⁺) puhastati sarnastes tingimustes, lisades ZnSO₄ nii söötmetele (lõppkontsentratsioon 3 µM) kui puhvritele (0,1 mM), et vältida võimalikku tsiingipuudust ja sellest tingitud L31A võimalikku inaktiivsust.

2.6. Ribosoomide eraldamine

Rakkude kasvatamine. Väljakülvid tehti LB tardsöötmele, millele oli lisatud deletsioonitüvede puhul kanamütsiini (lõppkontsentratsioon 50 µg/ml) ja pBADi sisaldavate tüvede puhul ampitsilliini (200 µg/ml). Bakterikultuure inkubeeriti 37°C juures üle öö. Üks koloonia inokuleeriti 2xYT söötmesse (50 ml), millele oli lisatud arabinoosi

(lõppkontsentratsioon 0,2%) ja ampitsilliini (0,1 mg/ml), kui bakteritüvi sisaldas pBAD plasmidi, või deletsioonitüvede korral kanamütsiini (25 µg/ml) ning kasvatati öö läbi loksutil (180 rpm, 37°C).

Üleöökuultuuri optilise tiheduse ($A_{600\text{nm}}$) alusel tehti lahjendus 2xYT-sse (2000 ml), millele oli plasmidi pBAD olemasolul lisatud arabinoosi (0,2%) ja ampitsilliini (0,1 mg/ml) ning deletsioonitüvede puhul kanamütsiini (25 µg/ml). Lahjendus tehti arvestusega, et bakterikultuuri algtihedus oleks $A_{600\text{nm}} \sim 0,05$. *E. coli* rakud koguti hilises eksponentsiaalses kasvufaasis ($A_{600\text{nm}} \sim 2$) ROTINA lauatsentrifuugis (4500 rpm, 20 min, 4°C).

70S ribosoomide eraldamine. *E. coli* rakud võeti üles ribosoomi lüüsipuhvril (lahuse lõppruumala 35 ml), millele oli lisatud ensüümid DNase I (lõppkontsentratsioon 40 U/ml) ja lüsotsüüm (lõppkontsentratsioon 2 mg/ml). Ribosoomi lüüsipuhvri koostis 20 mM Tris (pH=7,5), 100 mM NH_4Cl , 10 mM MgOAc , 0,5 mM EDTA, 3 mM β -merkaptopetaanol. Rakulahust segati rotaatoril 30 min, 4°C. Rakud lüüsi rakupressi abil (10 ml silinder, 100 mPa) ning lüsaat klaariti ultratsentrifuugis (16000 rpm, 20 min, 4°C, rootor Ti-45). Klaaritud lüsaadi ruumala viidi ribosoomi lüüsipuhvriga 50 ml-ni, proov kanti 20% sahharoosipadjale (20 mM Tris (pH=7,5), 500 mM NH_4Cl , 10 mM Mg-atsetaat, 0,5 mM EDTA, 20% sahharoos, 3 mM β -merkaptopetaanol) ning tsentrifuugiti öö läbi (rootor Ti-45, $\omega^2 t = 8,5 \cdot 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 4°C).

Alternatiivina rakupressile kasutati *Precellys 24* homogenisaatorit (*Bertin Technologies*), kus rakud lüüsi kolme 60-sekundilise tsükliga. Rakulüsaat klaariti lauatsentrifuugis (13000 rpm, 20 min, 4°C). Lahuse optiline tihedus mõõdeti 260 nm juures, ruumala viidi ribosoomi lüüsipuhvriga 50 ml-ni ning kanti 20% sahharoosipadjale ja ultratsentrifuugiti öö läbi ($\omega^2 t = 8,5 \cdot 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 4°C, Ti-14 rootor).

Läbi sahharoosipadja tsentrifuugitud ribosoomide sadet pesti 5 ml *overlay*-10 puhvriga (OV-10: 20 mM Tris (pH=7,5), 100 mM NH_4Cl , 10 mM Mg-atsetaat, 0,25 mM EDTA, 3 mM β -merkaptopetaanol), suspendeeriti 10 ml-s samas puhvril ning segati 4 tundi 4°C juures rotaatoril. Lahus klaariti ultratsentrifuugis (16000 rpm, 30 min, 4°C, Ti 50 rootor) ning lisati sellele sahharoosilahust (lõppkontsentratsioon 5%). Ribosoomide hulga kvantifitseerimiseks mõõdeti klaaritud lahuse optiline tihedus lainepikkusel $A_{260\text{nm}}$. Proovi maht viidi OV-10 puhvriga 50 ml-ni.

Ribosoomide eraldamiseks laeti 50 ml proovi (3300–4000 U) 10–35% sahharoosigradiendile OV-10 puhvril ning ultratsentrifuugiti öö läbi ($\omega^2 t = 2,0 \cdot 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 4°C, Ti-15 rootor).

Fraktsioonid pumbati rootorist välja ning need visualiseeriti UVis 920 läbivooluspektrofotomeetri ($A_{260\text{nm}}$) ja REC112 isekirjutaja abil. Manuaalselt koguti 70S fraktsioon, milles ribosoomide hulga määramiseks mõõdeti lahuse optiline tihedus ($A_{260\text{nm}}$). 70S fraktsiooni tsentrifuugiti öö läbi ($\omega^2t = 1,2 \cdot 10^{12} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 4°C , Ti-45 rootor). Ribosoomide sadet pesti 10 ml OV-10 puhvriga, suspendeeriti samas puhvril, mille ruumala oli valitud nii, et ribosoomide kontsentratsioon oleks u. $0,5 \text{ U}/\mu\text{l}$ ja segati rotaatoril (4 h, 4°C). Ribosoomide hulga määramiseks mõõdeti lahuse optiline tihedus lainepikkusel $A_{260\text{nm}}$.

50S ja 30S subühikute eraldamine. Subühikute eraldamiseks kasutati dissotseerivat ehk 10–25% sahharoosigradiendi OV-1 puhvril (20 mM Tris (pH=7,5), 100 mM NH_4Cl , 1 mM Mg-atsetaat, 0,25 mM EDTA, 3 mM β -merkaptopetaanol). 70S lahuse Mg^{2+} kontsentratsiooni langetati OV-0 puhvriga (koostis sama mis OV-1 puhul, ainult magneesiumatsetaati ole lisatud) 10 mM-lt 1 mM-ni (lahuse lõppruumala 12 ml). Lahust kontsentreeriti, tsentrifuugides, kasutades 100 kDa Amicon Ultra-15 tsentrifugaalfiltri (4000 *rcf* juures 10 minutit). Kontsentreeritud lahus (5 ml) jaotati kuue 10–25% 38ml sahharoosigediendi vahel (puhver OV-1) arvestusega 100–130U A_{260} lüsaati ühe gradiendi kohta ning ultratsentrifuugiti üle öö ($\omega^2t = 2,7 \cdot 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 4°C , SW-28 rootor).

Subühikute fraktsioonid (50S – 47ml; 30S – 25ml) eraldati gradiendiprofiili alusel nagu varem 70S puhul. Kogutud fraktsioonide ruumalad viidi OV-1 puhvriga 50 ml-ni ning magneesiumatsetaadi lisamisega tõsteti magneesiumiioonide kontsentratsiooni 1mM-lt 10 mM-le. Subühikute hulga määramiseks mõõdeti lahuse optiline tihedus 260 nm juures. Seejärel ultratsentrifuugiti 30S ja 50S lahused üle öö ($\omega^2t = 1,2 \cdot 10^{12} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 4°C , Ti-45 rootor). Subühikute sademeid pesti 2 ml OV-10 puhvriga ning suspendeeriti samas puhvril arvestusega, et lahuse lõppkontsentratsioon oleks vahemikus $0,25\text{--}0,5 \text{ U}/\mu\text{l}$. Subühikute lahuseid klaariti lauatsentrifuugis (13000 *rpm*, 20 min, 4°C) ja mõõdeti nende optiline tihedus ($A_{260\text{nm}}$).

2.7. Ribosoomide profiil

Deletsioonitüvesid kasvatati 2xYT + Km (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) söötmes loksutil. Bakterikultuuri kasvu jälgiti optilise tiheduse mõõtmise kaudu. Bakterikultuurist võeti proovid (50-100 ml) $A_{600\text{nm}} \sim 0,5$ ja $1,5$ ja $3,0$ ning 24, 48 ja 72 tunni möödumisel inokulatsioonist. Rakud lüüsi rakupressiga ja lüsaat klaariti nagu kirjeldatud ribosoomide eraldamise alapeatükis. 30 $A_{260\text{nm}}$ ühikut materjali kanti 15 – 30% sahharoosigradiendile OV-10 puhvril ning ultratsentrifuugiti

($\omega^2 t = 2,7 \cdot 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, SW-28 rootor, 4°C). Fraktsioonid visualiseeriti nagu ribosoomide eraldamise puhul.

2.8. *In vitro* assotsiatsioonikatse

Segati 5 U ($A_{260\text{nm}}$) 50S ja 5 U ($A_{260\text{nm}}$) 30S subühikuid (mõlemad OV-10 puhvris). Magneesiumikontsentratsioon viidi vastavate OV puhvritega 6, 8 või 12 mM-ni. Proove inkubeeriti 30 minutit 37°C juures, seejärel viidi ruumala vastavalt kas OV-6, OV-8 või OV-12 puhvriga 800 µl-ni ning kanti proovid neile vastava magneesiumi kontsentratsiooniga 10–25% sahharoosigradiendile. Proove ultratsentrifuugiti üle öö ($\omega^2 t = 2,6 \cdot 10^{11} \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 4°C, SW-28 rootor). Fraktsioonid pumbati rootorist välja ning visualiseeriti läbivooluspektrofotomeetri ($A_{260\text{nm}}$) ja isekirjutaja abil. Vastavalt katseskeemile lisati 50S ja OV-10 puhvrit sisaldavale lahusele kas TP50, puhastatud L31A, L31A^(Zn⁺) või L31B valku 2–3-kordses molaarses ülehulgas. Neid proove eelinkubeeriti enne 30S subühikute lisamist 15 minutit, 37°C.

3. Tulemused ja arutelu

3.1. Kasvufenotüübi analüüs

E. coli L31A-d ja L31B-d kodeerivad geenid ei ole elutähtsad, sest tüved, kus *rpmE* või *ykgM* on asendatud kanamüsiiniresistentsuskassetiga, on eluvõimelised, kuuludes Keio kollektsooni (Baba jt., 2006). Keio kollektsooni, mis koondab 3985 *E. coli* K-12 tüve ühe geeni deletsiooniga mutanti, koostades kontrolliti muteeritud tüvede kolooniate teket rikkal söötmel (LB+Km (30 µg/ml)) ja mõõdeti bakterikultuuri optilist tihedust nii nimetatud kui minimaalsöötmel (0,4% glükoos MOPS) (Baba jt., 2006). Vastavad andmed *rpmE* või *ykgM* suhtes puudulike tüvede kasvu kohta näitavad, et *E. coli* saab põhimõtteliselt funktsioneerida ka ilma ühe L31 paraloogiga (Baba jt., 2006).

Lähtuvalt sellest tõstatub küsimus, kas rakkude kasvufenotüübi seisukohast on oluline, kumb paraloogne geen on kromosoomis. Kui *rpmE* ja *ykgM* eraldi võttes ei ole elutähtsad, siis arvestades seda, et need kodeerivad r-valgu L31 paralooge, tekib küsimus, kui eluvõimeline on topeltdeletant ehk mõlema geeni suhtes puudulik tüvi võrreldes metsiktüübiga.

Käesoleva töö raames tehti esmane analüüs L31 paraloogide mõjust rakkude kasvufenotüübile ning rakendati alustuseks rakkude kasvuks soodsaid tingimusi (rikas sööde, 37°C). Selline keskkond ei peegelda küll looduses esinevaid keskkonnatingimusi, kuid sobib pikema uurimistöö tarvis eelteadmiste kogumiseks.

L31 mõju uurimiseks mõõdeti *E. coli* eri tüvede – metsiktüübi (MG1655), *rpmE* või *ykgM* deletandi ja nende topeltdeletandi – kasvu, kui 7-minutilise intervalliga registreeriti bakterikultuuride optiline tihedus ($A_{600\text{ nm}}$) rikkas (2xYT) söötmes 37°C juures. Iga tüve korral teostati vähemalt viis kuni kaheksa sõltumatut mõõtmist. Bakterikultuuri kasvu eksponentsiaalset faasi näitab poollogaritmilises teljestikus kasvukõvera lineaarne osa, mille tõusu põhjal arvutati (tõusu pöördväärtus on) generatsiooni- ehk pooldumisaeg. Pooldumisaeg on määratletud kui ajavahemik kahe järjestikuse pooldumise vahel või ajavahemik, mille jooksul kultuuri tihedus kahekordistub. Uuritud tüvede pooldumisaegade keskmised väärtused koos nende täpsust kajastava standardveaga on esitatud tabelis 3.

Tabel 3. Deletsioonitüvede pooldumisajad minutites. Tabelis on esitatud vähemalt seitsme sõltumatu mõõtmise keskmised koos standardvigadega, kui plasmidi on indutseeritud arabinoosiga (0,1%).

	tüvi	pooldumisaeg (min) ± st.viga
1.	MG1655 (metsiktüüpi tüvi)	24,8 ± 1,2
2.	MG1655 $\Delta rpmE::kan$ ($\Delta L31A$)	25,1 ± 1,7
3.	MG1655 $\Delta ykgM::kan$ ($\Delta L31B$)	23,2 ± 1,5
4.	MG1655 $\Delta rpmE\Delta ykgM::kan$ ($\Delta L31AB$)	37,3 ± 1,6

Katsetulemused näitavad, et logaritmilises kasvufaasis on üksikdeletantide pooldumisajad metsiktüübi omaga sarnased. Seega ei ole rakkude kasvukiiruse seisukohast vahet, kas kromosoomis on L31A-d või L31B-d kodeeriv geen.

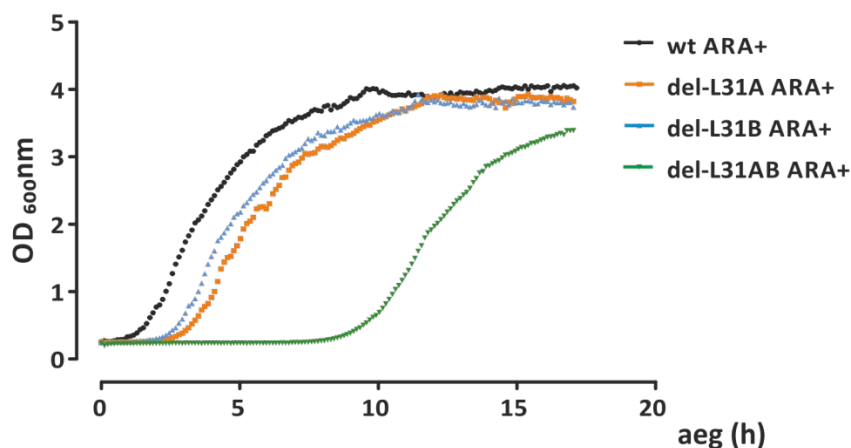
Ühtlasi on see tulemus kooskõlas kirjanduses avaldatuga, et *E. coli* L31 paraloogsed geenid ei ole elutähtsad (Baba jt., 2006; Tammsalu, 2012). See tulemus toetab spekulatsioone, et L31 paraloogidel on osaliselt kattuvad funktsioonid, st need saavad üksteist funktsionaalselt (vähemalt osaliselt) asendada. Sellele järeldusele jõuti ka *rpmE*-puuduliku tüve logaritmilise ja statsionaarse faasi ribosoomide valgulist koostist uurides, kui näidati vähesel määral L31B lülitumist ribosoomi juba kiire kasvu faasis (Tammsalu, 2012).

Siiski on rakkuse füsioloogia seisukohast tähtis, et genoom sisaldaks vähemalt üht L31 paraloogset geeni, sest mõlema geeni puudumisel kulub *E. coli* rakkudel jagunemiseks ligi kolmandiku võrra (33,5%) rohkem aega kui metsiktüübil. Samas pole tähtis, kas kromosoomis on *rpmE* või *ykgM*, sest mõlemal juhtumil on keskmine pooldumisaeg võrreldav metsiktüübi omaga.

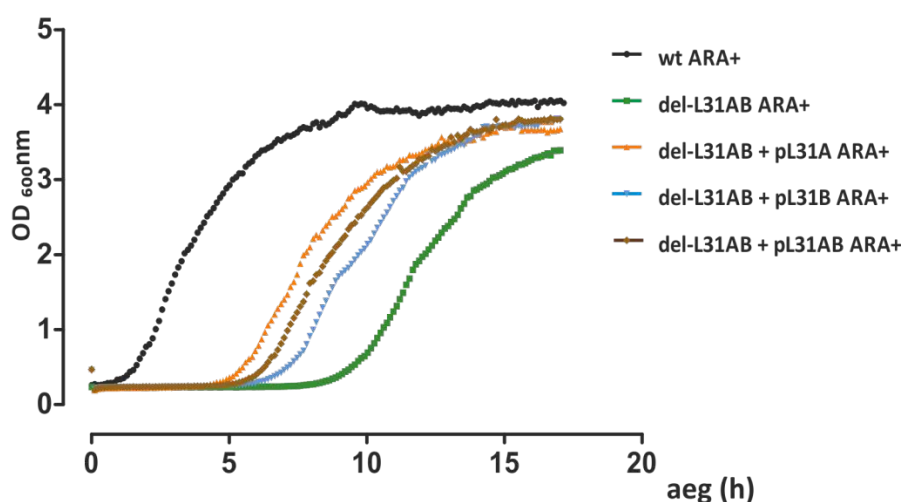
Olles arvutatud eksponentsiaalse kasvufaasi optilise tiheduse mõõtmistulemuste põhjal, näitab pooldumisaeg bakterikultuuri maksimaalset võimet kasvada/ rakkude võimet paljuneda antud katsetes kasutatud soodsates keskkonnatingimustes (2xYT, 37°C). Seda, kui kiiresti rakupopulatsioon kohaneb uue elukeskkonnaga ning hakkab jagunema, näitab lag-faasi pikkus (viide?). Deletsioonitüvede kasvukõveraid kõrvutades selgub, et üksikdeletantide puhul kestab lag-faas ligikaudu 2 korda kauem kui kontrollina kasutatud MG1655 tüve kultuuris (*resp.* 2h ja 1h) (joonis 5, paneel A). Sarnaselt pooldumisajale ei ole ka lag-faasi pikkuse seisukohast kummagi paraloogse geeni kasvufenotüüpide vahel märkimisväärset erinevust. Seevastu topeltdeletant vajab eksponentsiaalsesse kasvufaasi jõudmiseks

märkimisväärselt kauem aega (8 h) kui metsiktüüp (1 h) või üksikdeletandid (2 h), mis viitab sellele, et L31 on tarvilik rakkude kohanemisvõimele.

A



B



Joonis 5. Eri L31 deletsioonitüvede kasv rikkas söötmes (37°C).

Üleöökultuurist (2xYT, 37°C) tehti samasse söötmesse 100-kordne lahjendus, millest omakorda tehti 20-kordne lahjendus, kuhu lisati plasmidi pBAD indutseerimiseks arabinoosi (lõppkontsentratsioon 0,1%). Rakke kasvatati 2xYT söötmes 17 tundi (37°C), bakterikultuuri optilist tihedust (A_{600nm}) mõõdeti iga 7 minuti järel. (A) Deletsioonitüvede bakterikultuuride kasv. Topeltdeletandi lag-faas kestab märkimisväärselt kauem kui üksikdeletantidel. (B) Δ L31AB tüve kompensatsioonivariantide kasv. Plasmiidisel L31A või L31B ekspressioonil on Δ L31AB tüve rakkude lag-faas sarnase pikkusega ja ligi poole lühem kui topeltdeletandil. y-teljel optiline tihedus 600 nm juures, x-teljel mõõtmisaeg

Järgnevalt tehti kompensatsioonikatseid, kus L31 paraloogse geeni puudumist kromosoomis püüti korvata selle geenikoopia ekspressiooniga plasmiidilt pBAD. Selleks kasutati *E. coli* tüvesid $\Delta rpmE::kan$, $\Delta ykgM::kan$ ja $\Delta rpmE\Delta ykgM::kan$, keda oli transformeeritud vastavalt plasmiididega pBAD-*rpmE*, pBAD-*ykgM* ja pBAD-*rpmE-ykgM* (Aivar Liiv, Kai Virumäe). L31 paraloogsete geenide üleekspressiooni plasmiidilt pBAD indutseeriti arabinoosiga (lõppkontsentratsioon 0,1%) (negatiivsed kontrollid ilma arabinoosita) ning mõõdeti kultuuride optilist tihedust samadel keskkonnatingimustel nagu eelnevalt kirjeldatud katsetes deletsioonitüvedega.

Tabel 4. Puuduva või olemasoleva geeni lisamine plasmiidilt pBAD. Tabelis on esitatud vähemalt viie mõõtmise keskmised koos standardvigadega, kui plasmidi on indutseeritud arabinoosiga (0,1%).

	tüvi	plasmiid	pooldumisaeg (min) ± st.viga
1.	MG1655	-	24,8 ± 1,2
2.	$\Delta rpmE::kan$	-	25,1 ± 1,7
3.	$\Delta rpmE::kan$	pBAD- <i>rpmE</i>	36,6 ± 1,1
4.	$\Delta rpmE::kan$	pBAD- <i>ykgM</i>	25,4 ± 2,0
5.	$\Delta ykgM::kan$	-	23,2 ± 1,5
6.	$\Delta ykgM::kan$	pBAD- <i>rpmE</i>	23,8 ± 1,8
7.	$\Delta ykgM::kan$	pBAD- <i>ykgM</i>	24,2 ± 1,1
8.	$\Delta rpmE\Delta ykgM::kan$	-	37,8 ± 1,7
9.	$\Delta rpmE\Delta ykgM::kan$	pBAD- <i>rpmE-ykgM</i>	36,5 ± 4,5

Deletsioonitüve $\Delta ykgM::kan$ pooldumisaeg ei muutunud märkimisväärselt, kui plasmiidilt ekspresseerida kromosoomis puuduvat L31 paraloogset geeni (vrd tabel 4, read 5 ja 7). Samal tendentsil esineb kasvukiiruse muutumises ka siis, kui tõsta kromosomaalse geeni ekspressiooni vastava pBAD plasmidi abil (vrd tabel 4, read 2 ja 4 ning 5 ja 6). Järelikult ei mõjuta *rpmE* või *ykgM* geenidoos bakterikultuuri pooldumisaega. Selgusetu on $\Delta rpmE::kan$ tüve ligi 10 minuti võrra pikem pooldumisaeg, kui plasmiidilt ekspresseerida kromosoomis puuduvat geeni (tabel 4, rida 3).

Lähtudes tulemusest, et $\Delta rpmE\Delta ykgM::kan$ bakteritüve pooldumisaeg on ligi kolmandiku võrra pikem kui metsiktüübil (ja üksikdeletantidel), otsustati uurida, kas paraloogi plasmidse

geeniekspressiooni tulemusena võiks rakkude normaalne kasv taastuda. Selleks mõõdeti nii pBAD-*rpmE*-ga kui pBAD-*ykgM*-iga transformeeritud topeltdeletandi kultuuride kasvu. Tabel D näitab, et mõlema kombinatsiooni pooldumisaeg on üksteisele äärmiselt sarnane (tabel 5, read 3 ja 4) ning jääb üllatuslikult topeltdeletandi vastava väärtuse juurde (rida 2). Et rakkude kasv ei taastunud kummagi paraloogi plasmiidsel ekspressioonil, võib väita, et neil on sarnane üldine efekt rakkude kasvukiirusele, mis ei avaldu generatsiooniajale.

Kompensatsioonikatsed topeltdeletandiga näitasid, nagu poleks kumbki paraloog seotud Δ L31AB tüve märkimisväärselt aeglasema kasvuga rikkal söötmel 37°C juures. Kasvukiirus väheneb mõlema L31 paraloogi geeni üheaegsel puudumisel, kuid see ei taastu ühe paraloogi plasmiidsel ekspressioonil.

Tabel 5. Topeltdeletandi pooldumisajad L31 paraloogide A või B plasmiidsel ekspressioonil. Tabelis on esitatud vähemalt viie mõõtmise keskmised koos standardvigadega, kui plasmiidi on indutseeritud arabinoosiga (0,1%).

	tüvi	plasmiid	pooldumisaeg (min) ± st.viga
1.	MG1655	-	24,8 ± 1,2
2.	MG1655 $\Delta rpmE \Delta ykgM::kan$	-	37,8 ± 1,7
3.	MG1655 $\Delta rpmE \Delta ykgM::kan$	pBAD- <i>rpmE</i>	40,7 ± 3,1
4.	MG1655 $\Delta rpmE \Delta ykgM::kan$	pBAD- <i>ykgM</i>	41,3 ± 4,7
5.	MG1655 $\Delta rpmE \Delta ykgM::kan$	pBAD- <i>rpmE-ykgM</i>	36,5 ± 4,5

Samas võib olla, et kompensatsioonikatsetes ei ole näha L31 paraloogide mõju rakkude kasvukiirusele, sest nende plasmiidse ekspressiooniga esineb probleeme. Teadmata põhjustel ei pruugi r-alk plasmiidilt ekspresseeruda või saavutab r-alk normaalsest suuremas koguses esinemisel inaktiivse vormi. Kõrvaldamaks kõrge koopiaarvuga plasmiidile spetsiifilisi valguekspressiooni efekte, oleks tarvis kasvufenotüübi kompensatsioonikatseid korrata samade tüvedega, mida on transformeeritud madala koopiaarvuga plasmiidiga.

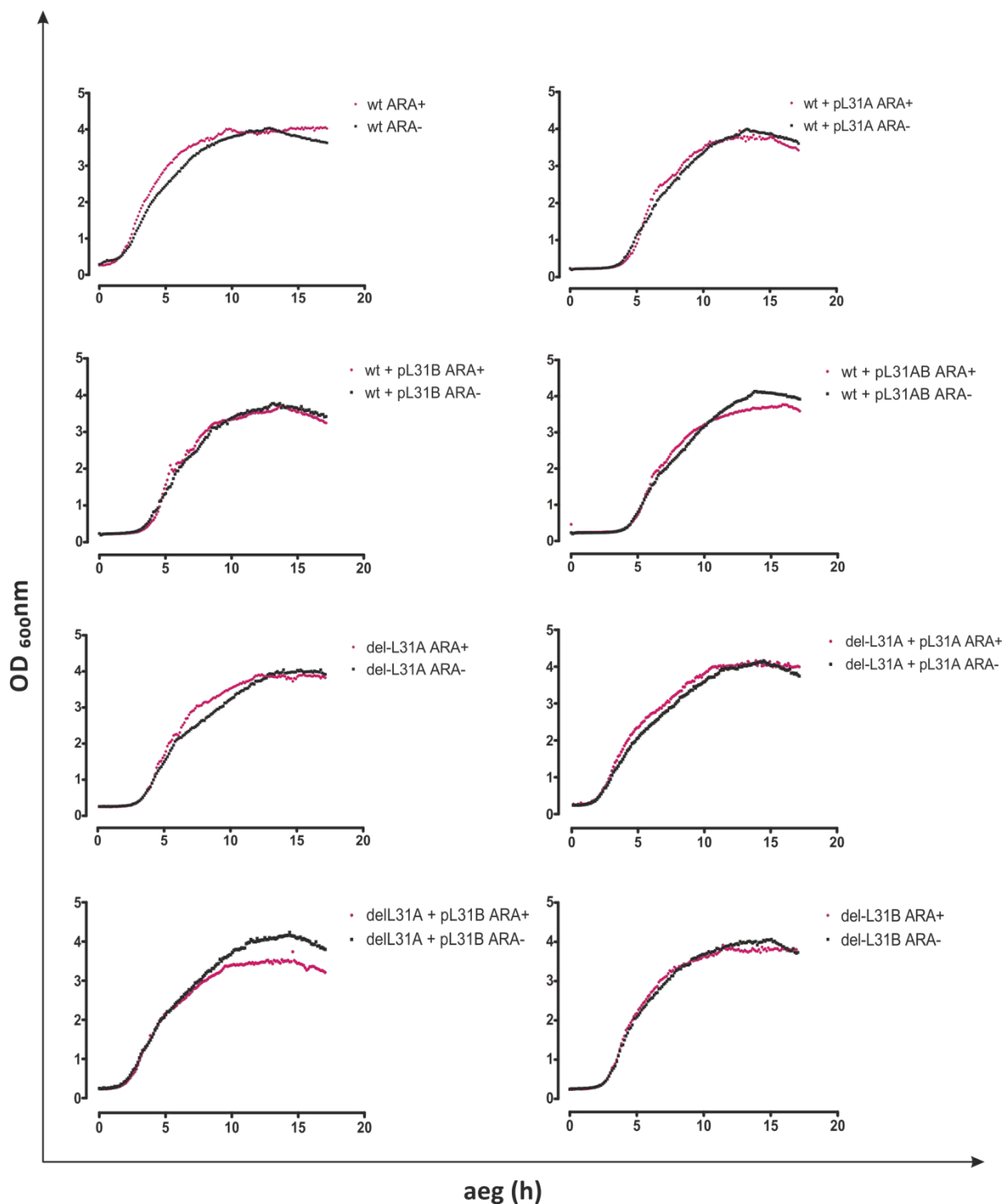
Kasvukõverate analüüs näitab, et topeltdeletandi puhul esineb väike erinevus lag-faasi pikkuses, mis näib sõltuvat sellest, mis L31 paraloogi ekspresseeritakse plasmiidilt pBAD (joonis 5, paneel B). Lag-faas on kõige pikem topeltdeletandi puhul (8 h), see lüheneb ligi kolme tunni võrra, kui topeltdeletandis üleekspresseeritakse L31B-d, või ligi nelja tunni võrra

L31A üleekspressioonil (joonis 5, paneel B). Üksikdeletantidel selline, üleekspressseeritavast L31 paraloogist sõltuv erinevus lag-faasi pikkuses puudub (andmed näitamata).

Kasvukõverate võrdlus söötmetes arabinoosiga (ARA+) ja ilma selleta (ARA-) näitab, et indutseeritud plasmiidiga topeltdeletandi bakterikultuurid kasvavad veidi kiiremini kui ilma arabinoosita paralleelid (joonis 6 järg), kuid mõlemad saavutavad mõõteperioodi lõpuks peaaegu sama tiheduse nii *rpmE* kui *ykgM* üleekspressiooni puhul (joonis 5, paneel B). Seega võib eeldada, et pBAD-ilt ekspresseeritakse vastavat L31 paraloogi, kuid selle mõju ei avaldu mitte niivõrd kasvukiirusele, vaid pigem lag-faasi pikkusele. Lag-faasi pikkust seostatakse rakupopulatsiooni kohanemisvõimega. See tulemus on kooskõlas hüpoteesiga, mille kohaselt on L31 paraloogid olulised rakkude kohanemisel muutuvate keskkonnatingimustega, mis antud juhul tähendab üleminekut statsionaarsest faasist lag-faasi kaudu kiireima kasvu faasi.

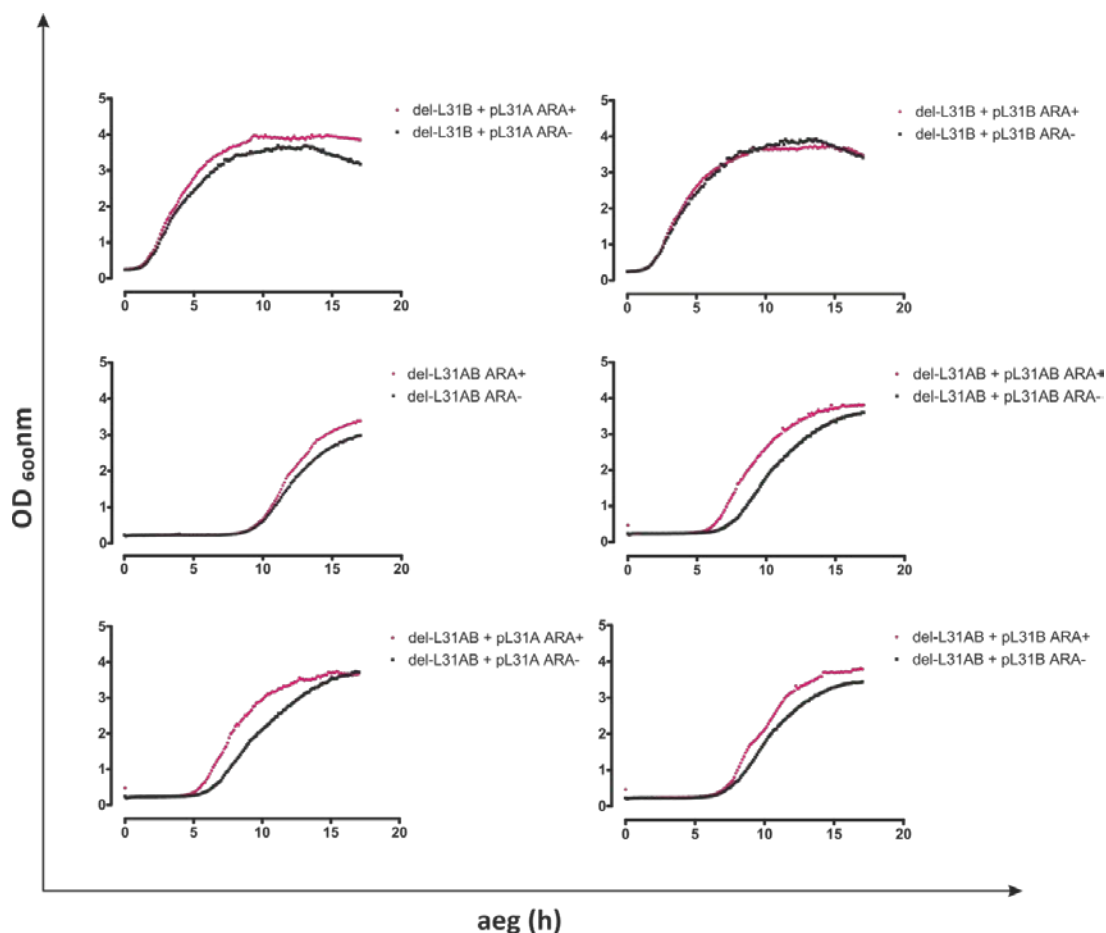
Bakterite kasvu mõõtmistulemusi tõlgendades tuleb meele pidada, et kasvufenotüübi analüüs annab *kaudseid* tõendeid L31 paraloogide võimalike funktsionaalsete erinevuste kohta. Tõendite kausus väljendub selles, et mõõdetakse rakkude tiheduse kasvu ajas, mis oma olemuselt on paljude füsioloogiliste protsesside tulem. *Ergo* ei ole võimalik selliste katsete tulemuste põhjal täpselt väita, mis rakuprotsesse L31 eksistents mõjutab. Edasist teaduslikku käsitlust vajab küsimus, missuguseid rakkude kasvuks (ja paljunemiseks) vajalikke protsesse mõjutab L31 ning milles seisneb see mõju neile protsessidele. Et L31 on ribosoomi valk, on loogiline selle funktsiooniotsinguid alustada ribosoomiga ja laiemalt translatsiooniga seondult. Samas ei tohiks välistada ka L31 võimalikke ekstraribosomaalseid funktsioone, sest L31 on võimeline *in vivo* dissotseeruma ribosoomist ja sellega reassotseeruma (Pulk jt., 2010).

Senini on L31 paraloogide bioloogilist funktsiooni uuritud nende tsingiiooni sidumise võime lähtepunktist. *Bacillus subtilis*'e mudelil on esitatud hüpotees, mille kohaselt asendab L31B tsingipuudusel ribosoomis L31A ja selle eraldumisel ribosoomist vabaneb L31A-ga seotud tsingiioon, mis muutub kättesaadavaks (Akanuma jt., 2006). L31A-st kui võimalikust tsingidepoost on motiveeritud L31 uuringud *E. coli*'s (Hensley jt., 2011).



Joonis 6. Eri L31 deletsioonitüvede kasvu sõltuvus L31 paraloogide ekspressioonist.

Katsekirjeldus sama mis joonise 5 puhul, ainult 20-kordsest lahjendusest võeti kaks proovi, millest ühele lisati arabinoosi (ARA+, lõppkontsentratsioon 0,1%), et plasmiidilt pBAD indutseerida L31 paraloogi ekspressiooni. Igal graafikul on esitatud eri bakteritüve (ja plasmidi) kultuuri kasvuandmed arabinoosiga söötmes (ARA+, tumeroosa) ja ilma arabinoosita (ARA-, must). y-teljel optiline tihedus 600 nm juures, x-teljel mõõtmisaeg



Joonis 6 (järg). Eri L31 deletsioonitüvede kasvu sõltuvus L31 paraloogide ekspressioonist.

Teine oluline aspekt kasvufenotüübi katsete tulemuste tõlgendamisel on konkreetsed katsetingimused, mis, nagu varem mainitud, ei peegelda looduses levinud tingimusi. Seega ei piirdu L31 mõju rakkude kasvule arvatavasti selles töös nähtud efektidega.

Antud magistritöös uuriti L31 mõju rakkude kasvule ning esimeses lähenduses rakendati paljunemiseks soodsaid tingimusi (rikas sööde, 37°C). Lähtuvalt põhitulemustest – L31paraloogide mõju kasvufenotüübile on sarnane ja vähemalt üks paraloogi kodeeriv geen on oluline metsiktüübile sarnase pooldumisaja säilitamiseks – tuleks laiendada keskkonnatingimuste valikut (temperatuur, pH, oksüdatiivset stressi tekitav peroksiid, Zn^{2+} , minimaalsööde).

3.2. Ribosoomide analüüs *in vivo*

Kasvufenotüübi analüüs andis kaudseid tõendeid L31 võimaliku mõju kohta rakkude kasvule. Ribosoomikeskse L31 mõju analüüsiks valiti kasvufenotüübi katsete põhjal deletsioonitüved, mille ribosoomide profiili kaudu saab hinnata 70S ja vabade subühikute osakaalu *in vivo*.

Et uurida L31 mõju 70S moodustumisele *in vivo*, analüüsiti üksik- ja topeltdeletantide ribosoomide profiili muutust ajas. Rakke kasvatati loksutil samadel tingimustel mis ribosoomide eraldamisel (rikas sööde, 37°C). Bakterikultuuri kasvu jälgiti optilise tiheduse mõõtmise kaudu ning proovid võeti $A_{600\text{nm}}$ väärtustel, mis tähistavad logaritmilist ($A_{600\text{nm}} \sim 0,5$ ja $1,5$) ja statsionaarset ($A_{600\text{nm}} \sim 3,0$) faasi, ning statsionaarset faasi ajapunktides (24, 48 ja 72 tundi pärast inokuleerimist). Rakud lüüsiiti homogenisaatoriga, lüsaat klaariti ning 20-30 $A_{260\text{nm}}$ ühikut nukleiinhapet sisaldavat rakulüsaati kanti 15–30% sahharoosigradiendile OV-10 puhvris ning lahutati ultratsentrifuugimisel. Fraktsioonid visualiseeriti UV-mõõdja ja isekirjutajaga.

Logaritmilises faasis kasvavad bakterirakud maksimaalse kiirusega ning vajavad seetõttu aktiivset valgusünteesi. Neid vajadusi peegeldab polüsoomide esinemine eri tüvede ribosoomide profiilis $A_{600\text{nm}} \sim 0,5$ ja $1,5$ juures (joonis 7, tulbad OD 0,5 ja OD 1,5). Varases logaritmilises faasis ($A_{600\text{nm}} \sim 0,5$) on ΔL31A tüves suhteliselt rohkem vabu subühikuid kui ΔL31B ja MG1655 tüvede puhul (joonis 7, tulp OD 0,5). Seda võib seletada 50S subühikute varustamiseks ebapiisava *ykgM* ekspressiooniga ja aktiivse subühikute biogeneesiga. Topeltdeletandis on samal ajal 70S ribosoomide osakaal väike võrreldes üksikdeletantide ja metsiktüübiga (joonis D, tulp OD 0,5) ja esineb eriti palju 50S subühikuid, mis viitab nende aktiivsele biogeneesile ja sellele, et need pole translatsiooniküpsed.

Järgmistes eksponentsiaalse ($A_{600\text{nm}} \sim 1,5$) ja statsionaarse faasi mõõtepunktides ($A_{600\text{nm}} \sim 3,0$) ning 24 h ning 48 h pärast inokulatsiooni sarnanevad üksikdeletantide ribosoomide profiilid metsiktüübi omaga 70S osakaalu poolest (joonis 7). ΔL31A tüve sarnasust metsiktüübiga saab seletada L31B ekspressiooni ja ribosoomi lülitumisega statsionaarses faasis (Tammsalu, 2012). ΔL31B tüve puhul võib eeldada L31A esinemist ribosoomides ka statsionaarses faasis, sest 70S partiklite piik ei vähene 48 tunniga.

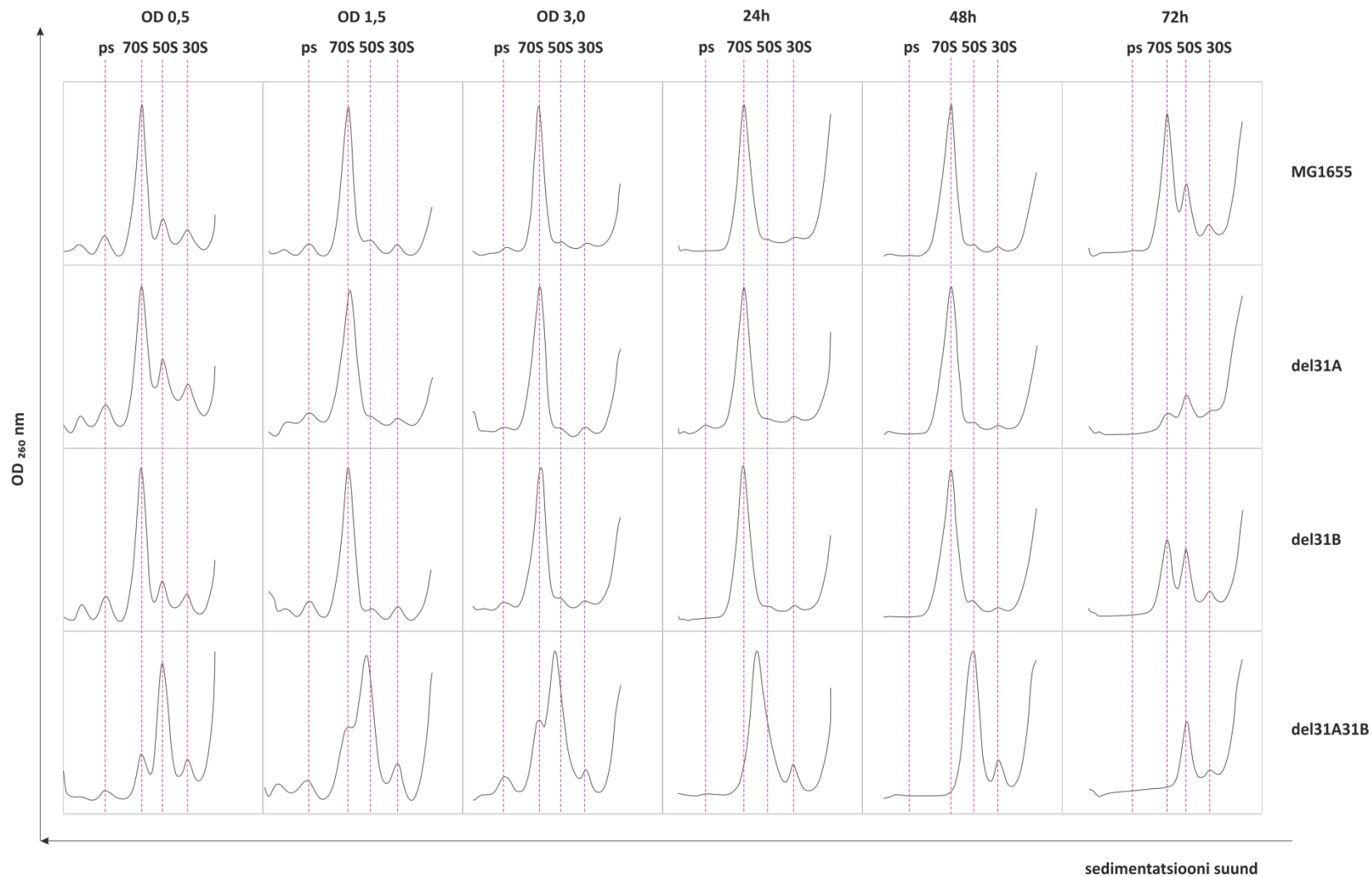
Statsionaarses faasis ei ole perioodilises kultuuris rakkude kasvuks vajalikke ressursse enam piisavalt, mistõttu väheneb valgusüntees ja aeglustub rakkude kasv. Kooskõlas nende teadmistega ei esine deletantide 24 h, 48 h, 72 h ribosoomide profiilidel polüsoomide fraktsiooni (joonis 7, tulbad 24h, 48h, 72h).

Erinevalt üksikdeletantidest esineb $\Delta L31AB$ tüve ribosoomi profiilidel märkimisväärsed erinevusi metsiktüübiga võrreldes. Esiteks, 70S partiklite osakaal jääb mõlemas kasvufaasis väiksemaks kui metsiktüübis ning esineb veel? 24 h ajapunktis (joonis 7, rida $\Delta L31AB$). Teiseks, alates $A_{600nm} \sim 1,5$ kuni 24 h esineb profiilides 70S ja 50S piikide vahepeal tõenäoliselt heterogeense koostisega fraktsioon? (50S, nn 60S). 70S partiklite ja polüsoomide esinemine $\Delta L31AB$ tüves logaritmilises ja varases statsionaarses faasis ($A_{600nm} \sim 3,0$) näitab, et vaatamata L31 puudumisele on ribosoomid translatsioonivõimelised, ja kinnitab, et *rpmE* ega *ykgM* puudumine ei ole *E. coli*'le letaalne.

Funktsionaalsete ribosoomide teke on oluline eeldus raku valgusünteesi vajaduse rahuldamiseks. Tõenäoliselt ei teki $\Delta L31$ tüves raku aktiivse valgusünteesi vajaduste katmise jaoks piisavalt 70S partikleid ja assotsieerunud 50S ja 30S partiklid, mis sedimenteervad 70S ja 50S vahepeal, ei näi funktsionaalselt kompenseerivat „õigete“ ribosoomide puudujääki. Seda hüpoteesi toetavad käesoleva töö tulemused $\Delta L31$ tüve kasvukiiruse kohta (tabel 3 kasvukiiruse ptk, joonis 5). Esiteks, topeltdeletandi pooldumisaeg on ligi kolmandiku võrra pikem kui metsiktüübil. Teiseks, $\Delta L31AB$ tüve lag-faas on ligi 4 korda pikem kui metsiktüübil ja ligikaudu 3 korda pikem kui üksikdeletantidel.

Statsionaarses faasis ei ole perioodilises kultuuris rakkude kasvuks vajalikke ressursse enam piisavalt, mistõttu väheneb valgusüntees ja aeglustub rakkude kasv. Kooskõlas nende teadmistega ei esine deletantide 24 h, 48 h, 72 h ribosoomide profiilidel polüsoomide fraktsiooni (joonis 7, tulbad 24h, 48h, 72h).

Kõige suuremad erinevused tüvede vahel ilmnevad 72 h ajapunktis, kus 70S osakaal on langenud drastiliselt nii $\Delta L31A$ tüves kui ka $\Delta L31B$ tüves (joonis 7, tulp 72h). $\Delta L31A$ tüves esinevat efekti saab selgitada nii, et võib-olla sisaldas gradiendile kantud lüsaat vähem ribosoomi kui teistel tüvedel, sest ühikuid mõõdetakse nukleiinhapete sisalduse kaudu (lisaks rRNA-le on rakus ka tRNA-d, mRNA-d). Samas võib ka olla, et $\Delta L31A$ tüves ongi 72. tunnil märkimisväärselt vähem ribosoomi. Võimaliku tsinginälja tingimustes ei saa erinevalt $\Delta L31B$ tüvest kasutada L31A valguga seotud tsinki mujal rakus, mistõttu rakkude kasv on pärsitud.



Joonis 7. Eri L31 deletsioonitüvede ribosoomide analüüs *in vivo*. Deletsioonitüvesid kasvatati rikkas söötmes loksutil ning võeti logaritmilist ja eksponentsiaalset kasvufaasi tähistavatel ajapunktidel proovid. Rakud lüüsi pressiga ning 20–30 A_{260nm} ühikut nukleiinhapet sisaldavat rakulüsaati kanti 15–30% sahharoosigradiendile OV-10 puhvris ning lahutati ultratsentrifuugimisel. Ribosoomide profiilid on esitatud tulpades bakterikultuuri optilise tiheduse järgi proovi võtmise ajal (OD 0,5; OD 1,5; OD 3,0) või proovivõtmisaja järgi (24 h, 48 h, 72 h). Punaste katkendjoontega on tähistatud polüsoomide (ps), 70S ribosoomide, 50S ja 30S subühikute omavaheline kaugus profiilil. y-teljel optiline neelduvus 260 nm juures, x-teljel sedimentatsiooni suund (paremalt vasakule)

Sarnaselt kasvufenotüübi katsetele kasvatati rakke eluks soodsatel tingimustel (rikas sööde, 37°C), mistõttu tuleb tõdeda, et L31 efektid 70S osakaalule ei pruugi piirduda siin kirjeldatutega. Stressitekitavate keskkonnatingimuste rakendamisel eksponentsiaalses faasis saaks uurida stressifaktori mõju rakkude 70S partiklite osakaalule ja L31 koostisele. Kas metsiktüübi ribosoomidesse lülitub stressi tingimustes L31B juba eksponentsiaalses faasis? Kas L31B ülesanne võiks seisneda kaasaaitamises ribosoomi funktsiooni *status quo* säilitamisele (valgusüntees saaks jätkuda) ebasoodsates keskkonnatingimustes? Sellist vaatenurka toetab fakt, et *in vitro* L31A dissotseerub madalal pH-l (vähem kui 5,5) ribosoomist, samas kui L31B on eri pH väärtuste suhtes püsivam (Kaspar Reier, avaldamata andmed).

Milles võiks seisneda L31B võimalik roll valgusünteesi jätkumisel stressikeskkonnas? Võimalik, et L31B seondumisel muutuvad ribosoomiga (miks mitte koostöös seni tuvastamata abifaktoritega) ribosoomi translatsioonikiirus, -täpsus. See oleks veel üks näide heterogeensete ribosoomide funktsionaalsusest.

3.3. L31A ja L31B ekspressioonivektorite konstrueerimine

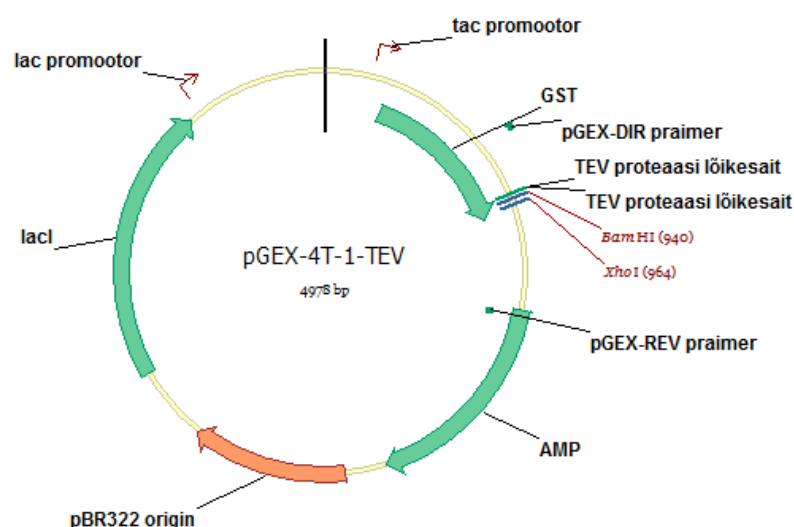
Selleks, et edasistes katsetes puhastada L31 paralooge ja kasutada neid biokeemilistes katsetes, otsustati konstrueerida L31A või L31B ekspressioonivektorid.

Ekspressioonisüsteemi valikul lähtuti sellest, et uuritavad valgud on väikesed (< 10 kDa) ja et puhastamise tulemusena on tarvis saada natiivset valku. Võttes arvesse neid aspekte otsustati kasutada plasmidi pGEX-4T-1-TEV. Tegu on kõrge koopiarvuga plasmiidiga, mis on disainitud IPTG-ga indutseeritava geeniekspressiooni saavutamiseks *E. coli*'s (*GST Handbook*). Ekspressioonivektoriks, mille multikloneerimissaiti kloneeriti *rpmE* või *ykgM* geen, valiti *GST Gene Fusion* süsteemi kuuluva plasmidi pGEX-4T-1 (*GST Gene Fusion System Handbook*) derivaat, mille trombiini lõikesait on asendatud TEV-proteaasi lõikesaidiga (J. Sedmani kingitus).

TEV proteaas, täpsemalt *Tobacco Etch Virus*'e kodeeritud NIa valgu katalüütiline domeen (27 kDa) on väga järjestusespetsiifiline, mistõttu on see laialdast kasutust leidnud liitvalkude lõikamisel (Kapust, 2001). TEV proteaasi lõikab efektiivselt ka GST-märgisega liitvalke. Lisaks on TEV proteaasi suhteliselt lihtne puhastada, mis muudab selle kasutamise soodsaks.

Ekspressioonivektori valik sõltus rekombinantse valgu puhastusstrateegiast, mis nägi käesoleva töö puhul ette selektiivsel GST sidumisel põhinevat afiinsuskromatograafiat ja GST ning uuritava valgu suuruse erinevusel põhinevat geelfiltratsiooni. Plasmiid pGEX-4T-1-TEV (joonis 8), mille multikloneerimissaiti on sisestatud kas geen *rpmE* või *ykgM*, kodeerib liitvalku GST-L31A või GST-L31B, mille aminoterminus on glutatioon-S-transferaasi (GST) märgis, karboksüterminuses L31A või L31B geeni järjestus ja nende vahel TEV-proteaasi lõikesait (joonis X). Liitvalgu ekspressioon on IPTG-ga indutseeritava *tac* promootori kontrolli all. Glutatioon-S-transferaas (GST) on vereimissis *Schistosoma japonicum* esinev 26 kDa suurune valk, mida saab *E. coli*'s ensümaatiliseltselt aktiivsena ekspresseerida (*GST Gene Fusion System Handbook*).

Plasmiid kodeerib ka LacI repressorit, mis takistab transkriptsiooni initsiatsiooni *tac* promootorilt, kui keskkonnas puudub IPTG. Liitvalgu hüdrofüüsil TEV proteaasiga tekivad GST (26 kDa) ja L31A (7,8 kDa) või L31B (9,9 kDa), mille suuruse erinevus on piisav nende lahutamiseks geelfiltratsioonil. Retsipientplasmidi paljundamiseks ja konstrueeritud plasmiidiga pGEX-*rpmE* või pGEX-*ykgM* transformatsiooniks valiti *E. coli* TOP10 rakud (Invitrogen), mida kasutatakse laialdaselt valkude ekspressiooniks.



Joonis 8. Ekspressiooniplasmiid pGEX-4T-1-TEV. Skeemil on toodud replikatsiooni alguskoht (*origin*) (oranž), LacI repressorit, GST-d ja amptsilliini resistentsust kodeerivad geenid (roheline). Nooled näitavad transkriptsiooni suunda ja *lac* ning *tac* promootorite asukohta. Plasmiidikaardil on tähistatud TEV proteaasi lõikesait (roheline) ja BamHI ning XhoI restriktsoonisaidid (sinine). pGEX praimerite ligikaudsed kinnitumiskohad on toodud roheliste täppidena.

Plasmiidi pGEX-4T-1-TEV (edaspidi pGEX) paljundati LB+Amp (lõppkontsentratsioon 200 µg/ml) söötmel *E. coli* TOP10 rakkudes, mis sobivad kõrge koopiarvuga plasmiidide efektiivseks paljundamiseks (*life technology*). Rakkudest eraldati plasmiidset DNA-d ning plasmiidi identsust kontrolliti restriктаasidega BamHI ja XhoI, DNA fragmendid lahutati 1% agarosgeelelektroforeesil, mille tulemusena saadud sarnase pikkusega fragmendid viitavad sellele, et tegu oli pGEX-ga.

E. coli tüvest MG1655 paljundati PRC meetodil geenide *rpmE* ja *ykgM* järjestused. Kasutatud oligonukleotiidide 5' otsa oli DIR-praimerite puhul lisatud BamHI lõikesait ja REV-praimeritel XhoI lõikesait. Seega sisaldasid PCR-i produktid lisaks geenijärjestusele mõlema restriктаasi lõikesaiti. PCR-i produktid lahutati 2% agarosgeelelektroforeesil, mille tulemused – DNA fragmentide asukoht geelil vastas nende eeldatavale pikkusele – näitasid PCR-i efektiivsust.

Rakkudest puhastatud plasmiid pGEX ja agarosgeelist puhastatud kahe geeni PCR-i produktid restrikteeriti paralleelselt ensüümiga BamHI (2 h, 37°C) ja puhastati reaktsioonisegust, sest järgnev restriksioon XhoI-ga (2 h, 37°C) vajab teistsugust ensüümi puhvrit. PRC-i produktid puhastati otse XhoI restriksioonisegust vastavalt *Spin PCRapace & MSB Vario Clean Up* protokollile, plasmiidse DNA jaoks rakendati lisapuhastusetappi 0,8% agarosgeelelektroforeesi näol, mille tulemused kinnitasid, et eraldatav DNA on sama pikkusega mis pGEX.

Ekspressiooniplasmiidi konstrueerimise viimases etapis ligeeriti samade ensüümidega restrikteeritud *rpmE* ja *ykgM* PCR-i produktid ja pGEX (60 min, toatemperatuur). Saadud konstruktidega transformeeriti *E. coli* TOP10 rakke. Ligatsiooni efektiivsuse kontrolliks tehti koloonia PCR paralleelselt viiele kolooniale (tekkinud ekspresiooniplasmiidi sisaldavatest transformantidest). Primerid olid valitud nii, et pGEX plasmiidist paljundati multikloneerimissaiti ja selle ümbrust, st PRC-i produktid sisaldasid ligatsioonil eeldatavalt sisestatud L31A või L31B geeni. PCR-i produktidele tehtud 1% agarosgeelelektroforeesipilt (tulemused näitamata) näitas, et analüüsitud kolooniates oli PCR-i produktidele vastava pikkusega fragmente, kuid kinnitamaks, et nende näol oli tegu tõepoolest *rpmE* ja *ykgM* gene sisaldavate fragmentidega, kasvatati transformeeritud rakke üle öö, eraldati neist plasmiidne DNA ja sekveneeriti see. Geenijärjestuste ja sekveneerimisandmete võrdlus näitas, et r-valke L31A või L31B kodeerivad geenid on pGEX plasmiidides.

Seega konstrueeriti ja valideeriti L31A-d ja L31B-d üleekspresseerivad pGEX-*rpmE* ja pGEX-*ykgM* plasmiidid. Nendega transformeeritud *E. coli* TOP10 rakke kasutati r-valgu L31 paraloogide ekspresseerimisel järgnevates puhastamiskatsetes.

3.4. Ribosoomi valgu L31 paraloogide L31A ja L31B puhastamine

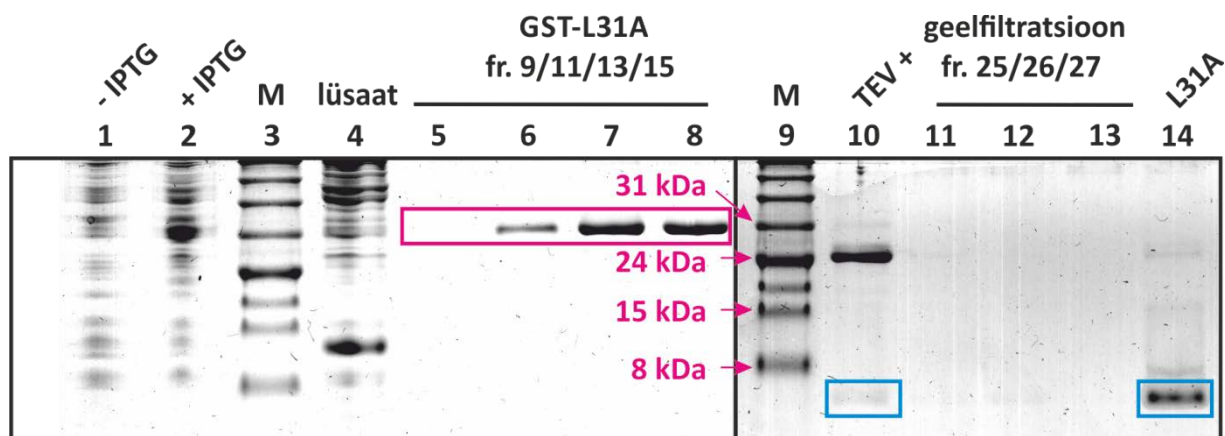
Lähtudes L31 võimalikust osalemisest *E. coli* subühikutevahelises sillas B1b (Shasmal jt., 2010), otsustati iseloomustada L31 paraloogide mõju subühikute *in vitro* assotsiatsioonile. Selle katse tarvis üleekspresseeriti neid valke ja puhastati aafiinsuskromatograafia ja geelfiltratsiooni meetoditega, kusjuures L31A ja L31B jaoks kasutati identset protokollit.

Tsinkisiduva valgu üleekspressioonil võib tekkida tsingipuudus, mistõttu osa ekspresseeritud valgust jääb ilma tsingiioonita. Vältimaks sellist olukorda ja sellest tuleneda võivad L31A inaktiivsust korrati L31A ekspressiooni, kui söötmele lisati 0,3 μ M lõppkontsentratsioonis ZnSO_4 , ja puhastusprotseduure, kui puhvritele lisati 0,1 mM tsinksulfaati.

Rekombinantsete L31 paraloogide ekspresseerimiseks kasutati käesoleva töö raames tehtud pGEX-*rpmE* või pGEX-*ykgM* ekspressioonikonstruktidega transformeeritud *E. coli* TOP10 rakke. Liitvalgu ekspressioon indutseeriti varajases logaritmilises kasvufaasis ($A_{600\text{ nm}} \sim 0,45$) lõppkontsentratsioonis 1 mM IPTG lisamisega. Tritsiin-SDS-PAAG analüüs (joonis 9) näitab, et rakkudes ekspresseeritakse liitvalku pärast induktsiooni suures koguses (vrd. rajad 1 ja 2).

Rakud lüüsi French pressiga, klaaritud rakulüsaat suspendeeriti LBM-150 puhvris ja kanti LB-150 puhvriga tasakaalustatud aafiinsuskromatograafiakolonnile *Glutathione Sepharose 4 FF*. Kolonni maatriksi moodustab ristseotud agaros, millele on 10-süsinikulise vahelüli (spacer) abil seotud glutatioon (*GE Healthcare LifeSciences*). GST märgisega valkude puhastamine põhineb GST selektiivsel seondumisel kolonni maatriksile kinnitunud glutatiooniga ja selle interaktsiooni katkemisel tänu elueerimispuhvris sisalduvale redutseeritud glutatioonile, mis tõrjub GST tema positsioonilt glutatiooni juures välja. Seondumine kolonnile sõltub proovi pealekandmise kiirusest, kusjuures aeglasemal pealekandmisel saavutatakse efektiivsem seondumine. GST-liitvalgu seondumine glutatiooniga on võrreldes Ni-His süsteemiga aeglasem, mistõttu kanti proov kolonnile kiirusega 0,3 ml/min, et liitvalk saaks efektiivselt seonduda oma ligandiga. Järgnes kolonni pesu etapp, kus sama puhvriga pesti välja kolonniga mitteseonduvad molekulid. Liitvalk jäi

GST kaudu kolonniga seotuks, kuni see elueeriti redutseeritud glutatiooni sisaldava LBG-100 puhvriga (fraktsiooni suurus 0,7 ml).



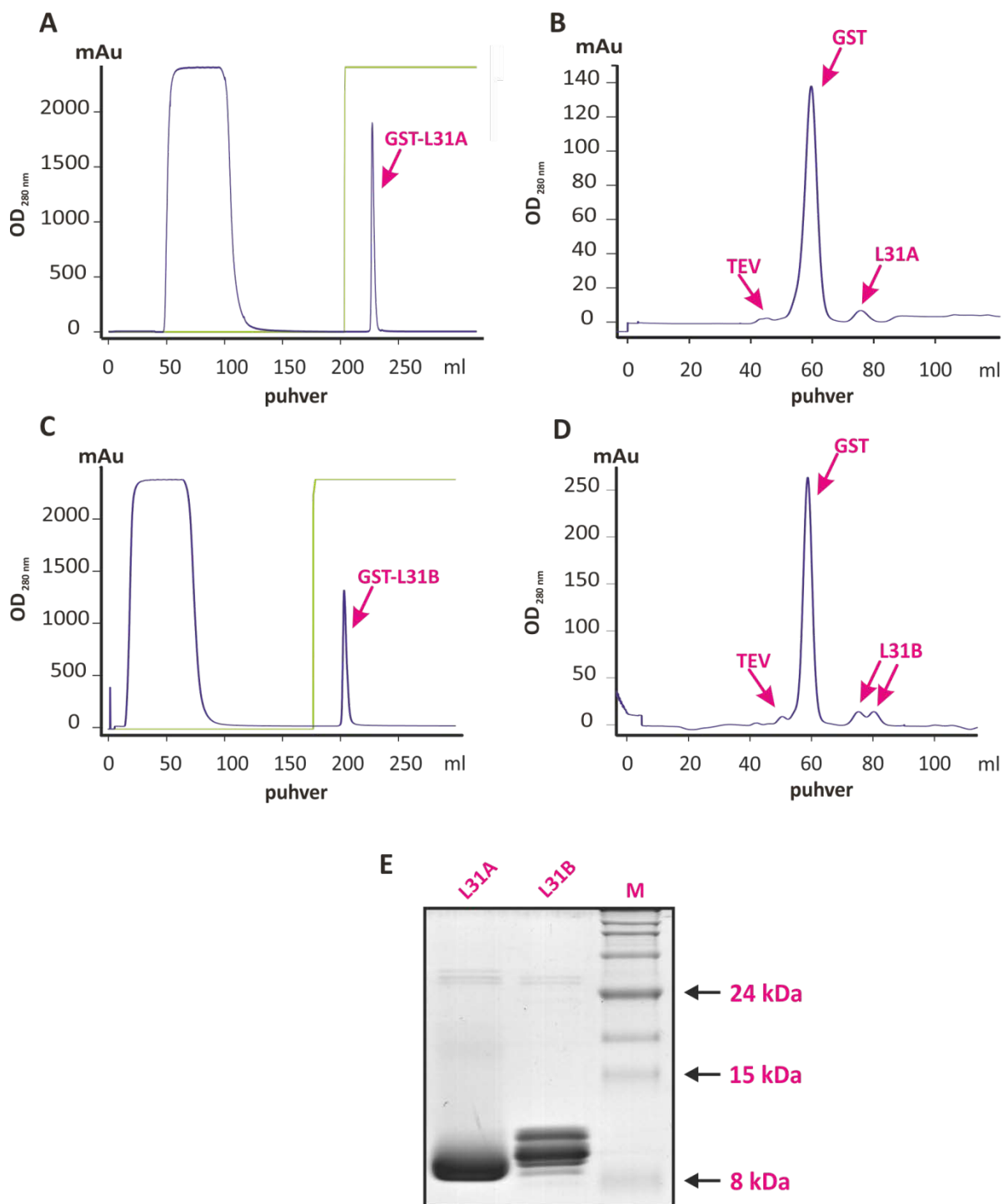
Joonis 9. L31 paralooide puhastamisetappide kontroll 16% tritsiin-SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforeesil (L31A^(Zn2+) näide). Radade tähistused: rakukultuur enne pGEX indutseerimist (rada 1) ja pärast (rada 2); rakulüsaat (rada 4), afiinsuskromatograafia liitvalku sisaldavad fraktsioonid (rajad 5–8), valgulahus pärast TEV proteaasiga tötlust (rada 10) ja pärast geelfiltratsiooni (rajad 11–13), kontsentreeritud L31A (rada 14). Kastides eeldatavasti liitvalku sisaldavad fraktsioonid (tumeroosa) ja L31A^(Zn2+) (sinine). M – marker *Protein Ladder Blue Prestained*

Nii GST-L31A, GST- L31A^(Zn2+) kui GST-L31B elueerusid afiinsuskromatograafiakolonnilt ühe selgesti eristatava piigina (joonis 10, paneelid A ja C), mis näitab mittespetsiifiliselt seondunud valkude puudumist. Meetodi head selektiivsust demonstreerivad ka kromatogrammide alusel välja valitud eeldatavasti liitvalku sisaldavad fraktsioonide proovide teravad triibud tritsiin-SDS-polüakrüülamiidgeelil (joonis 9, rajad 6–8). Käesolevas töös on esitatud vaid L31B ja L31A kromatogrammid, sest L31A graafikud ei erinenud L31A^(Zn2+) vastavatest graafikutest. Elueerimispuhvri kaaliumi kontsentratsioon (100 mM) on väiksem kui LBM-150 ja LBG-150 puhvrites, sest järgnev proteolüütiline tötlus TEV proteaasiga toimub efektiivsemalt just sellel K⁺ kontsentratsioonil.

Liitvalgud GST-L31A (33,8 kDa) ja GST-L31B (35,9 kDa) kontsentreeriti MILLIPORE 10 kDa tsentrifugaalfiltri abil (4000 *rcf*, 7 min). Liitvalgu proteolüütiliseks tötluseks inkubeeriti kontsentreeritud liitvalgulahust 3 tundi, 16°C TEV proteaasiga (massisuhtes 1:100, optimeerinud Aivar Liiv ja Kaspar Reier). Järgnevalt tõsteti K⁺ kontsentratsiooni 150 mM-ni, et see oleks võrdne geelfiltratsioonis kasutatava puhvriga. Pärast TEV proteaasiga tötlust eristuvad SDS-polüakrüülamiidgeelis nii GST-d (26 kDa) ja TEV proteaasi (27 kDa) sisaldav triip kui L31A^(Zn2+) (7,8 kDa) (joonis 9, rada 10).

Järgmises valgupuhastusetapis eraldati geelfiltratsiooniga TEV, GST ja L31A või L31B. LB-150 puhvriga tasakaalustatud kolonnile (*Superdex 75 16/60*; GE) kanti 2 ml proovi ja fraktsioone koguti automaatselt 4 ml kaupa. Kromatogrammidelt (joonis 10, paneelid B ja D) on näha TEV proteaasi, GST-d ja L31A-d või L31B-d tähistavad piigid. L31B elueerus kahe piigina, mille fraktsioonid ühendati, mõõdeti nende valgukontsentratsioon Bradfordi järgi ja analüüsiti piigi 1 ja piigi 2 valgusisaldust geelil ja mass-spektromeetria meetodil (Aivar Liiv, avaldamata andmed), mille tulemused kinnitasid, et mõlemad fraktsioonid sisaldasid L31B-d (andmed esitamata). L31B elueerus geelfiltratsioonikolonnilt kahe piigina ka kolmes korduskatses.

L31B elueerumist kahe piigina (joonis 10, paneel D) võib seletada L31 osalise proteolüüsiga, mille käigus eemaldatakse L31 C-terminusest 8 aminohappe pikkune fragment (Nesterchuk jt., 2011). See, miks ainult L31B elueerus kahe piigina, ei ole teada.



Joonis 10. L31 paraloogide puhastamine. Afiinsuskromatogrammid liitvalkude GST-L31A (paneel A) ja GST-L31B (C) puhastamise kohta ning geelfiltratsiooni kromatogrammid L31A (B) ja L31B (D) puhastamise kohta. Lahuse optiline neeldumine on tähistatud lilla ja elueerimispuhver rohelise joonega. Puhastatud ja kontsentreeritud L31A ja L31B valkude kontroll 16% tritsiin-SDS-PAAG-il (E). M – marker *Protein Ladder Blue Prestained*

Geelfiltratsiooni kromatogrammide alusel valiti välja eeldatavalt L31A-d ja L31B-d sisaldavad fraktsioonid, mille vastava r-valgu sisalduse kontrolliks tehtud 16% tritsiin-SDS-PAAG näitab vastavate paraloogide olemasolu (L31A^(Zn²⁺) kohta joonis 9 rajad 11–13). Kuigi joonisel 9 näidatud geelfiltratsiooni fraktsioonides näib olevat vähe L31A^(Zn²⁺), siis pärast valgu (7,8 kDa) kontsentreerimist 3 kDa tsentrifugaalfiltriga (4000 *rcf*, 40 min) on uuritav r-valk hästi tuvastatav (rada 14).

Puhastatud L31 variantide valgulahuse kontsentratsioon määrati Bradfordini reaktsiooni kaudu ja NanoDrop'iga, kasutades puhastatud valkude teoreetiliselt arvatud ekstinktsioonikoefitsiente (programm ProtParam, <http://web.expasy.org/protparam/>).

3.5. Subühikute assotsiatsioon

Hüpotees L31 osaluse kohta *E. coli* subühikute vahelises sillas B1b on püstitatud arvutisimulatsioonide põhjal, mis paigutasid selle r-valgu N- ja C-terminaalsete osade mudeleid ribosoomi klassikalise ja „*ratcheted state*“ krüoEM kaartidele (Shasmal jt., 2010). L31 paiknemine 50S subühiku keskses kühmus L5 juures oli välja pakutud *T. thermophilus*'e 70S pretranslokatsioonilise ribosoomi kristallstruktuuri põhjal (Selmer jt., 2006). Ka esmased *E. coli* struktuuriuuringud toetavad L31 osalemist alaühikute vaheliste kontaktides (A. Pulk, avaldamata andmed).

Lähtuvalt sellest otsustati käesolevas töös kontrollida tööhüpoteesi, mille kohaselt L31 mõjutab *E. coli* subühikutevahelistes kontaktides osalemise kaudu 70S moodustumist. Arvestades paraloogide esinemist *E. coli* r-valgul L31, tekib küsimus, kas ühe või teise paraloogse valgu esinemine suures subühikus mõjutab 70S ribosoomi moodustumist ehk teisisõnu kas L31 paraloogid on subühikute assotsiatsiooni vaatenurgast funktsionaalselt sarnased või erinevad? Tulenevalt kasutatud meetoditest saab käesoleva töö raames uurida, kas L31 osaleb 70S partiklite formeerumisel, ja selle kaudu teha järeldusi L31 rolli kohta subühikutevaheliste kontaktide tekkel (aga mitte dünaamilal), kuid ei ole võimalik kinnitada, et L31 osaleb sillal B1b.

Kirjandusest on teada, et L31 dissotseerub kõrgetel soolakontsentratsioonidel kergesti ribosoomist (Eistetter jt., 1999) ja on võimeline vahetuma lahuse ja ribosoomi vahel, kui lahuses on vabade ribosoomi valkude ülehulk (ribosoomide reparatsiooni hüpotees; Pulk jt., 2010). Seega on küsimus selles, kas L31 variantide (L31A ja L31B) suhtes puudulik 50S

subühik ($\Delta L31$) on võimeline seondama üht või teist paraloogi *in vitro* ja muutma seeläbi oma assotsiatsioonivõimet 70S moodustumisel.

In vivo tingimustes mõjutavad subühikute omavahelist afiinsust lisaks subühikutevahelistele sildadele veel tRNA, mRNA ja translatsioonifaktorid, mille koosmõju võib potentsiaalselt vähendada L31 puudumisest või selle paraloogide erinevustest põhjustatud assotsiatsioonifenotüüpi. Analüüsima L31 paraloogidest tulenevaid efekte alaühikute assotsiatsioonile, tehti katseid käesoleva töö raames 70S ribosoomist dissotseeritud puhastatud 50S ja 30S subühikute ning puhastatud L31A või L31B valguga.

L31 (variantide) rolli väljaselgitamiseks subühikute omavahelisel liitumisel viidi läbi rida assotsiatsioonikatseid, kus kasutati metsiktüüpi 30S subühikuid *E. coli* tüvest MRE600 ja L31 suhtes variantseid 50S subühikuid, mis eraldati 70S partiklitest dissotseerivas sahharoosigradiendis (1 mM Mg^{2+}). Dissotseeritud 50S subühikute kasutamise tingis vajadus välistada nende mitteassotseerumine muudel kui L31-st ja katsetes varieeritavast Mg^{2+} kontsentratsioonist sõltuval põhjustel (nt subühikute biogeneesi defektid). Erinevalt vabadest 50S subühikutest, mille puhul on teada, et märkimisväärne osa nendest ei ole funktsionaalset aktiivsed (Aivar Liiv, avaldamata andmed), on dissotseeritud 50S subühikud kuulunud 70S partiklite koosseisu. Dissotseeritud 50S subühikute assotsiatsioonivõime on leidnud väljundi translatsiooniliselt aktiivsete ribosoomide moodustumisel. Ribosoomid, millest eraldati assotsiatsioonikatsetes kasutatud 50S subühikud, olid puhastatud ühe või mõlema L31 variandi geeni suhtes puudulikest *E. coli* tüvedest (tähistus edaspidi $\Delta L31A$, $\Delta L31B$ ja $\Delta L31AB$) ja deltetsioonitüvedest, kus ekspresseeriti ühte või teist paraloogset valku kõrge koopiarvuga plasmiidilt pBAD/*Myc*-HisC (nt $\Delta L31A$ + pBADL31A).

Enamik subühikutevahelisi sildu koosneb kas osaliselt või täielikult rRNA-st (Gao jt., 2003), mille ruumilise struktuuri stabiliseerimisel osalevad magneesiumioonid (Schuwirth jt., 2005). Arvestades magneesiumiioonide olulisust subühikutevahelistes kontaktides (Selmer jt., 2006), otsustati varieerida selle divalentse metalliooni kontsentratsiooni. Assotsiatsioonikatsetes kasutatud magneesiumi kontsentratsioonid (6, 8, 12 mM) valiti lähtuvalt sellest, et subühikute assotsiatsioonivõime avaldub eelkõige 6–12 mM Mg^{2+} juures (Liiv ja O'Connor, 2006).

Katse üldskeem nägi ette, et 5 ühikut (A_{260nm}) dissotseeritud 50S subühikuid OV-10 puhvris segati vastavalt katseskeemile kokku 2-4 kordses ülehulgas kas puhastatud L31A või L31B-ga ning inkubeeriti 15 minutit (37°C), et uuritava r-valgu paraloog saaks seonduda 50S subühikuga. Seejärel lisati 5 ühikut (A_{260nm}) dissotseeritud metsiktüüpi 30S alaühikuid (ligi kahekordne ülehulk) ja sobiva Mg-atsetaadi kontsentratsiooniga OV puhvrit nii, et Mg^{2+}

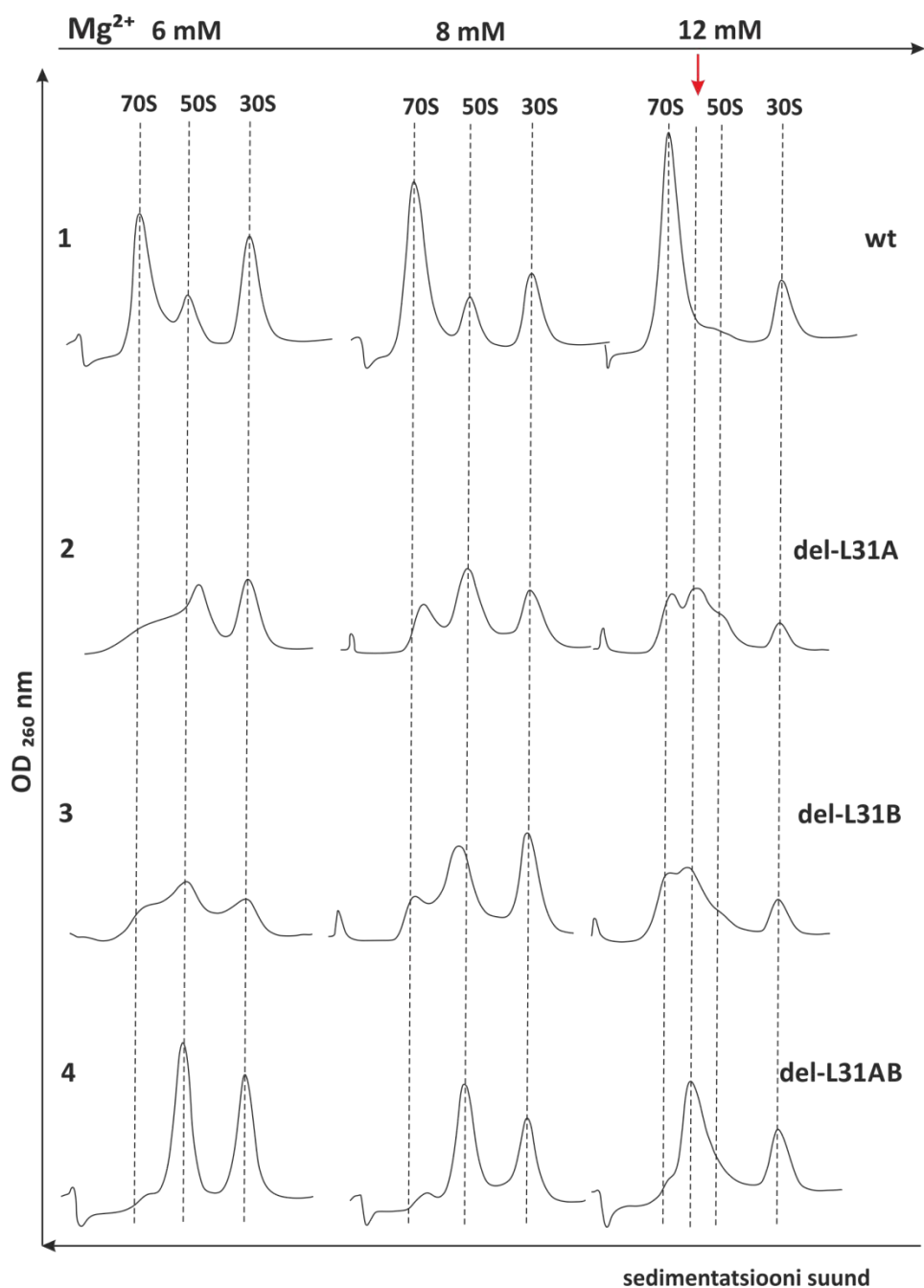
kontsentratsioon reaktsioonisegus oleks 6, 8, või 12 mM. Iga 50S tüübil põhinevat assotsiatsioonikombinatsiooni tehti paralleelselt nii 6, 8 kui 12 mM Mg^{2+} kontsentratsioonil. Lahuseid inkubeeriti 30 minutit 37°C juures ning 70S ribosoomi moodustumise efektiivsust analüüsiti 10–25% sahharoosigradiendis, mille magneesiumikontsentratsioon vastas peale kantud assotsiatsiooniproovi omale. Saadud gradiendiprofiilidel põhineb alljärgnev analüüs L31 (variantide) osalusest subühikute assotsiatsioonil.

Assotsiatsioonikatsed deletsioonitüvede 50S subühikutega

Kui hüpotees – L31 on subühikute vahelise silla komponent – vastab tõele, peaks deletsioonitüvede puhul esinema assotsiatsiooni gradiendiprofiilis muutusi võrreldes metsiktüübiga. Mõlema üksikdeletandi ($\Delta L31A$ ja $\Delta L31B$) puhul esineb oodatult tendents, et mida kõrgem on Mg^{2+} kontsentratsioon, seda rohkem tekib assotsiatsioonil 70S ribosoomi ja seda vähem jääb lahusesse vabu subühikuid (joonis 11, read 2 ja 3). Üksikdeletantide puhul moodustub metsiktüübiga võrreldes suhteliselt vähem 70S subühikuid (70S ja 50S piikide kõrguste vahe väiksem). Olulise erinevusena kontrollist on 12 mM Mg^{2+} juures 70S ja 50S vahele tekkinud lisapiik, mille esinemine seletab seda, et vabade 50S subühikute piik on sama kõrge nii wt kui üksikdeletantide puhul. Järelikult moodustavad 50S subühikuid nii 70S kui „vahepealse“ sedimentatsiooniga partikleid.

Ka topeltdeletandi ($\Delta L31AB$) assotsiatsiooni puhul kehtib mõlema üksikdeletandi puhul ilmnenud seos Mg^{2+} kontsentratsiooni ja 70S moodustumise vahel, kuid 70S partikleid tekib võrreldes üksikdeletantide ja metsiktüübiga minimaalselt (joonis 11, rida 4). Seega on L31 oluline, et tekiks 70S partikleid.

Sarnaselt $\Delta L31A$ ja $\Delta L31B$ profiilidele ilmneb ka topeltdeletandi puhul 12 mM Mg^{2+} juures korduvalt 70S ja 50S vahele lisapiik (joonis 11, rida 4). Järelikult võib eeldada, et selles fraktsioonis esinevad $\Delta L31$ ribosoomid, mis on 70S partiklist L31 puudumise tõttu „natuke kergemad“ ja väiksema tihedusega, mistõttu need sedimenteervad „aeglasemalt“. $\Delta L31$ 50S subühikud on võimelised assotseeruma 30S subühikutega, kuid tekkinud partiklite sedimentatsioon erineb märkimisväärselt kanooniliste ribosoomide omast (joonis 11, read 1 ja 4). Lisapiiki sedimenteerinud ribosoomi nimetatakse edaspidi 60S ribosoomideks.



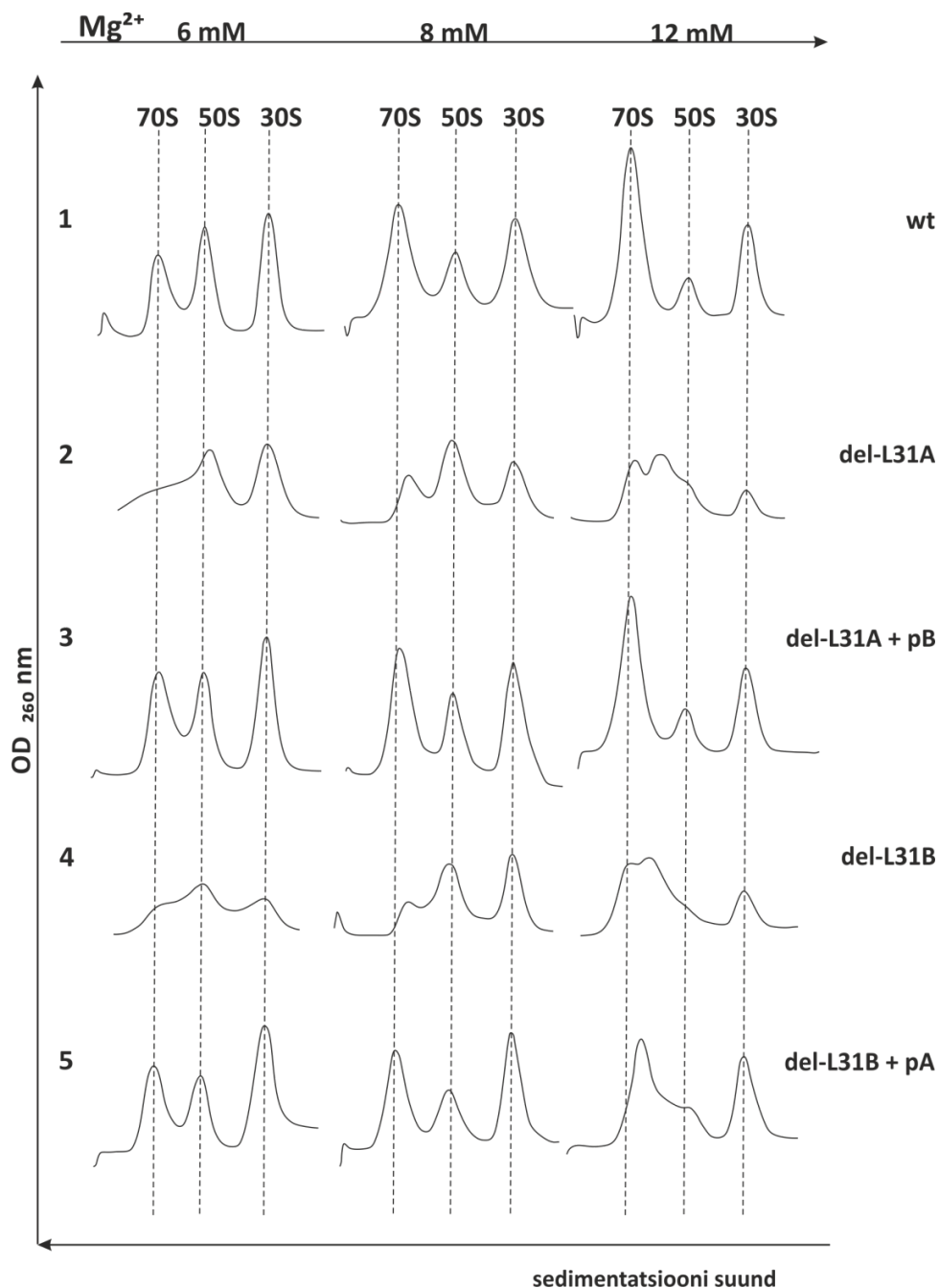
Joonis 11. Eri L31 deletsioonitüvede subühikute assotsiatsioon. Segati 5 U ($A_{260\text{nm}}$) 50S ja 5 U ($A_{260\text{nm}}$) 30S subühikuid, magneesiumi kontsentratsioon viidi 6, 8 või 12 mM-ni. Proove inkubeeriti 30 minutit (37°C), proovid kanti neile vastava magneesiumi kontsentratsiooniga 10–25% sahharoosigradiendile ja ultratsentrifuugiti. Katkendjoontega on tähistatud 70S partiklite, 50S ja 30S subühikute omavaheline kaugus sahharoosigradiendis, punane nool näitab „vahepealset“ 60S piiki. y-teljel optiline tihedus 260 nm juures, x-teljel üleval Mg²⁺ kontsentratsioon ja all sedimentatsiooni suund (paremalt vasakule)

Fakt, et nimetatud „vahepealne“ piik esineb järjekindlalt ka üksikdeletantide assotsiatsioonil (joonis 11, read 2 ja 3), näitab, et lahuses on samaaegselt nii ühe L31 paraloogiga kui Δ L31 ribosoomid. Et assotsiatsioonil kasutati ainult dissotseeritud 50S subühikuid, võib eeldada, et mõlemat tüüpi ribosoomid on translatsioonivõimelised. Seega võime spekuloida, et üksikdeletantide puhul on tegu heterogeensete ribosoomide populatsiooniga, sest üksikdeletantide 50S ribosoomide populatsioon sisaldab ka ribosoomi, milles puuduvad mõlemad L31 paraloogid.

Nähtavasti ei ole 60S ribosoomid funktsionaalselt nii võimekad kui kanoonilised 70S partiklid. Δ L31 ribosoomide võimaliku väiksema funktsionaalse võimekuse bioloogiline olemus on edaspidiste eksperimentide võtmeküsimusi. Seega on keske tähtsusega, kas sellised ribosoomid viivad translatsiooni läbi aeglasemalt või ebatäpsemalt ning milliseid translatsioonitsükli protsesse L31 moduleerib. Kirjanduses spekuloidakse L31 moduleeriva rolli üle *ratchet*-liikumisel (Shasmal jt., 2010) ja tRNA valikul ribosoomi A-saiti (Jenner jt., 2010). *In vitro* translatsioonikatsed aitaksid mõista L31 rolli valgusünteesi erinevates apektides.

Δ L31A assotsiatsioonikatsete gradiendiprofiilide analüüs ja võrdlus Δ L31 profiilidega näitasid, et Δ L31A tüvest eraldatud subühikute assotsiatsioonil esineb lahuses kahte tüüpi ribosoomi. Osa ribosoomi, mis sedimenteerub 70S fraktsiooni, sisaldab eeldatavasti L31B-d. Seda hüpoteesi toetab L31B identifitseerimine Δ L31A tüve logaritmilise faasi rakkudest eraldatud ribosoomides mass-spektromeetria meetoditega (Tammsalu, 2012). Seega võib väita, et L31A geeni puudumisel ekspresseeritakse teatud määral ka juba logaritmilises kasvufaasis (ilma Zn^{2+} näljata) L31B-d kodeerivat geeni *ykgM*.

Δ L31 ribosoomide esinemine Δ L31A tüves viitab sellele, et mingil põhjusel ei ole *ykgM* ekspressioon piisav, et „varustada“ eksponentsiaalses kasvufaasis L31B-ga kõiki 50S subühikuid. Viimane on kooskõlas L31B-d kodeeriva geeni ekspressiooni regulatsiooniga, sest eksponentsiaalse kasvu faasis takistab Zn^{2+} -ga seotud ZUR repressor transkriptsiooni geenilt *ykgM* (Nanamiya jt., 2004). Eraldades ribosoomi kiire kasvufaasi lõpul on seega meil populatsioon ribosoomi mis ei sisalda kumbagi paraloogi. Seda võimalust toetab antud valgu üleekspressioonil saadud assotsiatsiooni gradiendiprofiil (Δ L31A + pBAD-B), kus Δ L31A profiilist detekteeritud 60S ribosoomide piik on kadunud ja 70S piik märgatavalt kõrgeenenud (joonis 12, rida 3). Seega tekkisid Δ L31 ribosoomid Δ L31A tüves ebapiisava L31B ekspressiooni ja Zn^{2+} tingitud L31B operoni repressiooni tõttu.



Joonis 12. Eri L31 deletsioonitüvede subühikute assotsiatsioon. Katkendjoontega on tähistatud 70S partiklite, 50S ja 30S subühikute omavaheline kaugus sahharoosigradiendis. y-teljel optiline tihedus 260 nm juures, x-teljel üleval Mg^{2+} kontsentratsioon ja all sedimentatsiooni suund (paremalt vasakule)

Δ L31A tüves assotseeruvad 6 mM juures eelkõige L31B ribosoomid (70S piik on väike, vahepealset 60S piiki pole); 8 mM juures assotseeruvad vähesel määral ka Δ L31 50S subühikud (tekib väike vahepealne piik); 12 mM assotseeruvad mõlemat tüüpi 50S

subühikud. Seega on subühikutevahelised interaktsioonid tugevamad L31B ribosoomide puhul, sest 70S partiklid on detekteeritavad juba 6 mM Mg^{2+} juures (joonis 11, rida 2).

Analoogselt Δ L31A assotsiatsiooniprofiilidele võib ka Δ L31B profiilide põhjal väita, et assotsiatsioonil tekib kahte tüüpi ribosoomi: 70S fraktsioonis on eeldatavasti L31A ribosoomid (70S osakaal tõuseb koos Mg^{2+} kontsentratsiooniga) ja 60S piigis paiknevad Δ L31 ribosoomid. L31A-d sisaldavate subühikute eksistents on kooskõlas seniste teadmistega *rpmE* ekspressioonist logaritmilise kasvufaasis (Nanamiya jt., 2004) ja geeniproducti lülitumisest ribosoomi (Tammsalu, 2012).

Eeldatavasti L31 variantsete ribosoomide olemasolu üksikdeletantides näitab, et heterogeensus võib esineda neist tüvedest eraldatud ribosoomidel ka mitte stressi tekitavates keskkonnatingimustes. Ribosoomide valguline koostis fookusega L31 paralogidel vajab L31 variantsetes tüvedes (Δ L31A, Δ L31B) täiendavat uurimist proteoomika meetoditega.

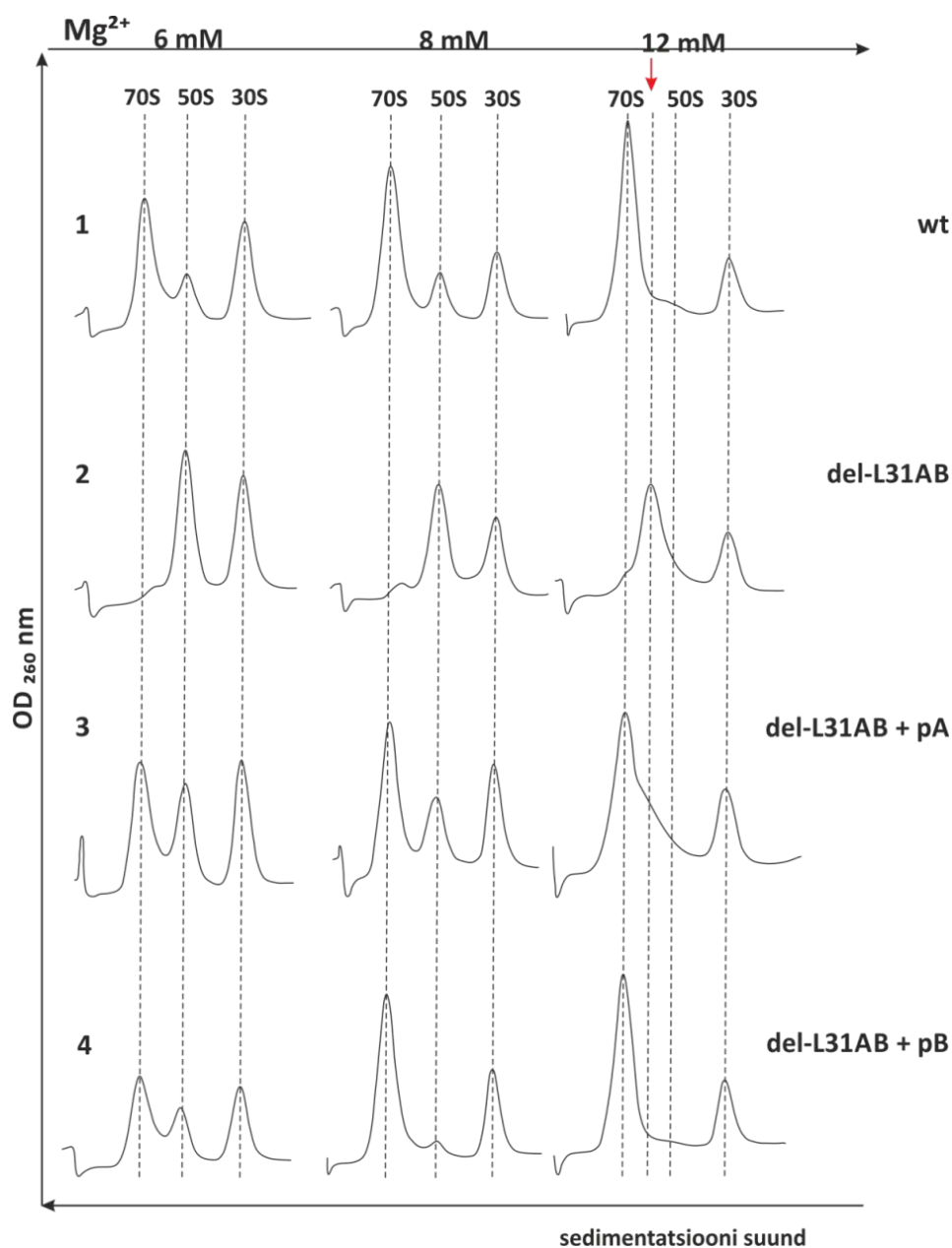
Kompensatsioonikatsed Δ L31 suurte subühikutega

Uurimaks L31 paraloogide panust subühikute assotsiatsioonil, viidi läbi katseid Δ L31AB + pBAD-L31A ja Δ L31AB + pBAD-L31B tüvedest eraldatud suurte subühikutega. Selliste nn kompensatsioonikatsete eesmärk on tuvastada ja analüüsida võimalikke subühikute assotsiatsiooni erinevusi, mida saab seostada L31 paraloogidega suures subühikus. Põhimõtteliselt saab antud katsesüsteemi korral esineda kahte tüüpi ribosoomi: osa sisaldab plasmiidilt ekspresseeritud L31 paraloogi ja osa on L31 suhtes puudulik.

Δ L31AB + pA kombinatsiooni puhul tekib 70S ribosoomi juba 6 mM Mg^{2+} juures ning nende osakaal tõuseb vastavalt Mg^{2+} kontsentratsiooni tõusule (joonis 13, rida 3). Kõige kõrgemal magnsesiumikontsentratsioonil esineb topeltdeletandi profiilile vastav „vahepealne“ piik, mis osutab, et selles fraktsioonis on Δ L31 ribosoomid. Nimetatud 60S piik esineb ainult 12 mM Mg^{2+} , mis näitab, et Δ L31 suured subühikud vajavad assotseerumiseks kõrgemat Mg^{2+} kontsentratsiooni kui L31A 50S subühikud. Võimalik, et Δ L31 50S subühikud moodustavad assotsiatsioonil 30S subühikutega kokkuvõttes vähem või nõrgemaid kontakte, mistõttu alaühikud dissotseeruvad kergemini. Seda nõrgemat assotseeritust aitab kompenseerida kõrgem Mg^{2+} kontsentratsioon.

Sarnaselt topeltdeletandiga, mille puhul ekspresseeriti plasmiidilt pBAD L31A-d, tekib ka L31B üleekspressioonil samas tüves 70S ribosoomide piik juba 6mM Mg^{2+} juures (joonis 13, rida 4), mis viitab nende suhteliselt tugevale assotsiatsioonivõimele. Erinevalt võrdlustüvest ja sarnaselt metsiktüübile esineb 12 mM Mg^{2+} kontsentratsioonil Δ L31AB + pB puhul väike

60S piik ei ole võimalik eristada „vahepealsete“ piiki, (mis vihjab sellele, et Δ L31 ribosome on minimaalselt ning enamik ribosome sisaldab L31B valku. Seega võib eeldada, et L31B plasmidsel ekspressioonil lülitub L31B suurtesse subühikutesse ning „taastab“ metsiktüübi assotsiatsiooni fenotüübi. Kompensatsioonikatsel põhjal Δ L31AB tüvega võime väita, et heterogeensete ribosoomide populatsioon esineb valdavalt L31A plasmidsel ekspressioonil.



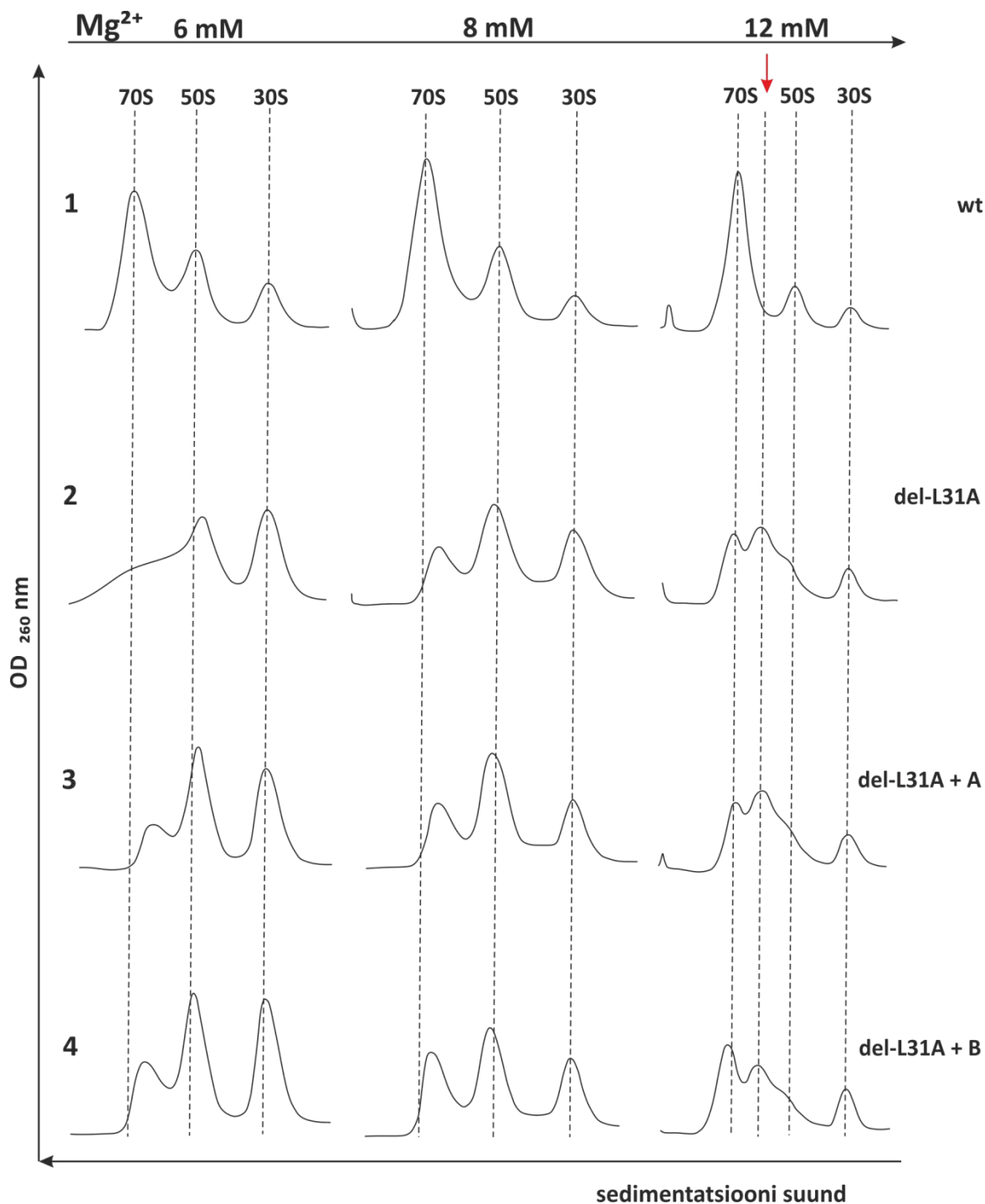
Joonis 13. Topeldeleteetsioonitüve subühikute assotsiatsioon. Katkendjoontega on tähistatud 70S partiklite, 50S ja 30S subühikute omavaheline kaugus sahharoosigradiendis, punane nool näitab „vahepealset“ 60S piiki. y-teljel optiline tihedus 260 nm juures, x-teljel üleval Mg²⁺ kontsentratsioon ja all sedimentatsiooni suund (paremalt vasakule)

Valgu lisamine *in vitro*

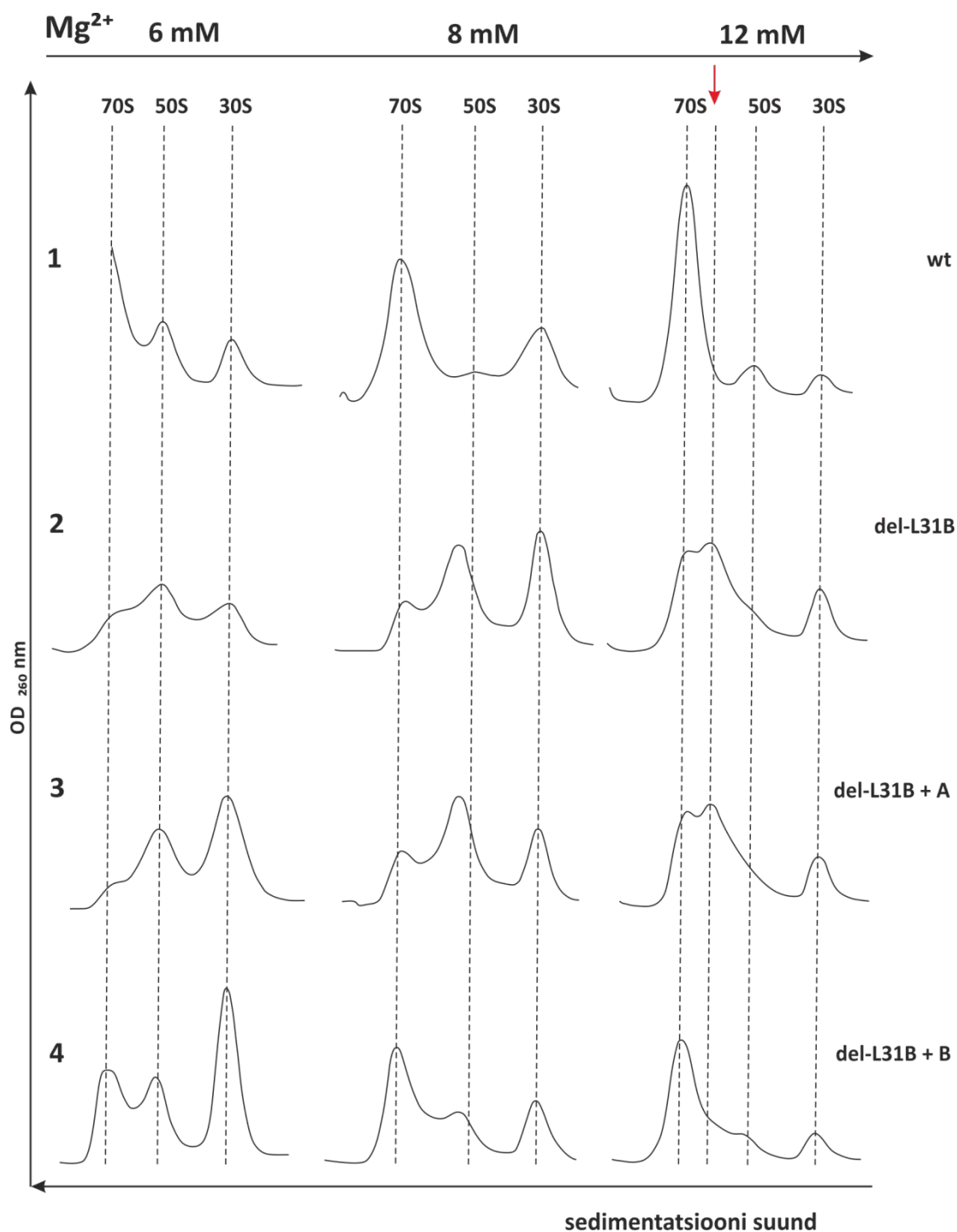
L31 kuulub nn vahetuvate r-valkude hulka, mis on võimelised translatsiooniküpselt ribosoomist dissotseeruma ja taaslülituma lahusest ribosoomi (Pulk jt., 2010). Ka on kirjanduses spekulatsioonid L31 mitte eriti tugevate kontaktide üle ribosoomiga, sest on näidatud, et L31 eemaldub dissotseerub kõrgetel soolakontsentratsioonidel ribosoomist (Eistetter jt., 1999). Seoses sellega, et Pulk jt. (2010) poolt avaldatud töös käsitleti L31 mõistes selle paralooži L31A (r-valgud olid ekstraheeritud ribosoomidest, mis olid eraldatud eksponentsiaalse kasvufaasi bakterikultuurist ($OD_{600nm} = 0,3$), tekib küsimus, kas ka L31B on võimeline lülituma *in vitro* küpsesse ribosoomi. L31B lülitumist on *in vivo* juba näidatud (Tammsalu, 2012).

Antud katseseria lisati deletsioonitüvedest dissotseeritud 50S subühikutele käesoleva töö raames puhastatud L31A või L31B valku. Kui 50S ribosoomidele lisati antud tüves puuduv L31 paraloog, siis esines kaht tüüpi assotsiatsiooniprofiile. $\Delta L31A + A$ kombinatsiooni gradiendiprofiil sarnanes vastava deletandi omale (joonis 14, read 2 ja 3): kõigil magneesiumi kontsentratsioonidel esines 60S piik, hoolimata L31A lisamisest assotsiatsioonilahusesse. „Vahepealse“ 60S piigi esinemise põhjal võib eeldada, et L31A valk ei inkorporeerunud 50S subühikutesse (eelinkubatsioon) ega ribosoomi (inkubatsioon 30S subühikutega). Võimalik, et L31A lülitumine ribosoomi vajab lisafaktoreid.

Vastupidine on olukord $\Delta L31B + B$ variandi korral, kui L31B *in vitro* lisamise tagajärjel suureneb kõigil magneesiumikontsentratsioonidel 70S partiklite hulk võrreldes vastava üksikdeletandiga ning gradiendiprofiil sarnaneb metsiktüübi omaga (joonis 15, read 1 ja 4). Seega võib väita, et L31B on võimeline lülituma ribosoomi ilma abifaktoriteta.



Joonis 14. Subühikute assotsiatsioon, kui Δ L31A tüve 50S subühikutele on lisatud puhastatud L31 paralooqe. Enne 50S ja 30S subühikute kokkusegamist lisati 50S subühikutele 2-3-kordses molaarses ülehulgas puhastatud L31A või L31B valku ning eelinkubeeriti 15 minutit (37°C). Katkendjoontega on tähistatud 70S partiklite, 50S ja 30S subühikute omavaheline kaugus sahharoosigradiendis, punane nool näitab „vahepealset“ 60S piiki. y-teljel optiline tihedus 260 nm juures, x-teljel üleval Mg²⁺ kontsentratsioon ja all sedimentatsiooni suund (paremalt vasakule)



Joonis 15. Subühikute assotsiatsioon, kui Δ L31B tüve 50S subühikutele on lisatud puhastatud L31 paralooge. Enne 50S ja 30S subühikute kokkusegamist lisati 50S subühikutele 2-3-kordses molaarses ülehulgas puhastatud L31A või L31B valku ning eelinkubeeriti 15 minutit (37°C). Katkendjoontega on tähistatud 70S partiklite, 50S ja 30S subühikute omavaheline kaugus sahharoosigradiendis, punane nool näitab „vahepealset“ 60S piiki. y-teljel optiline tihedus 260 nm juures, x-teljel üleval Mg^{2+} kontsentratsioon ja all sedimentatsiooni suund (paremalt vasakule)

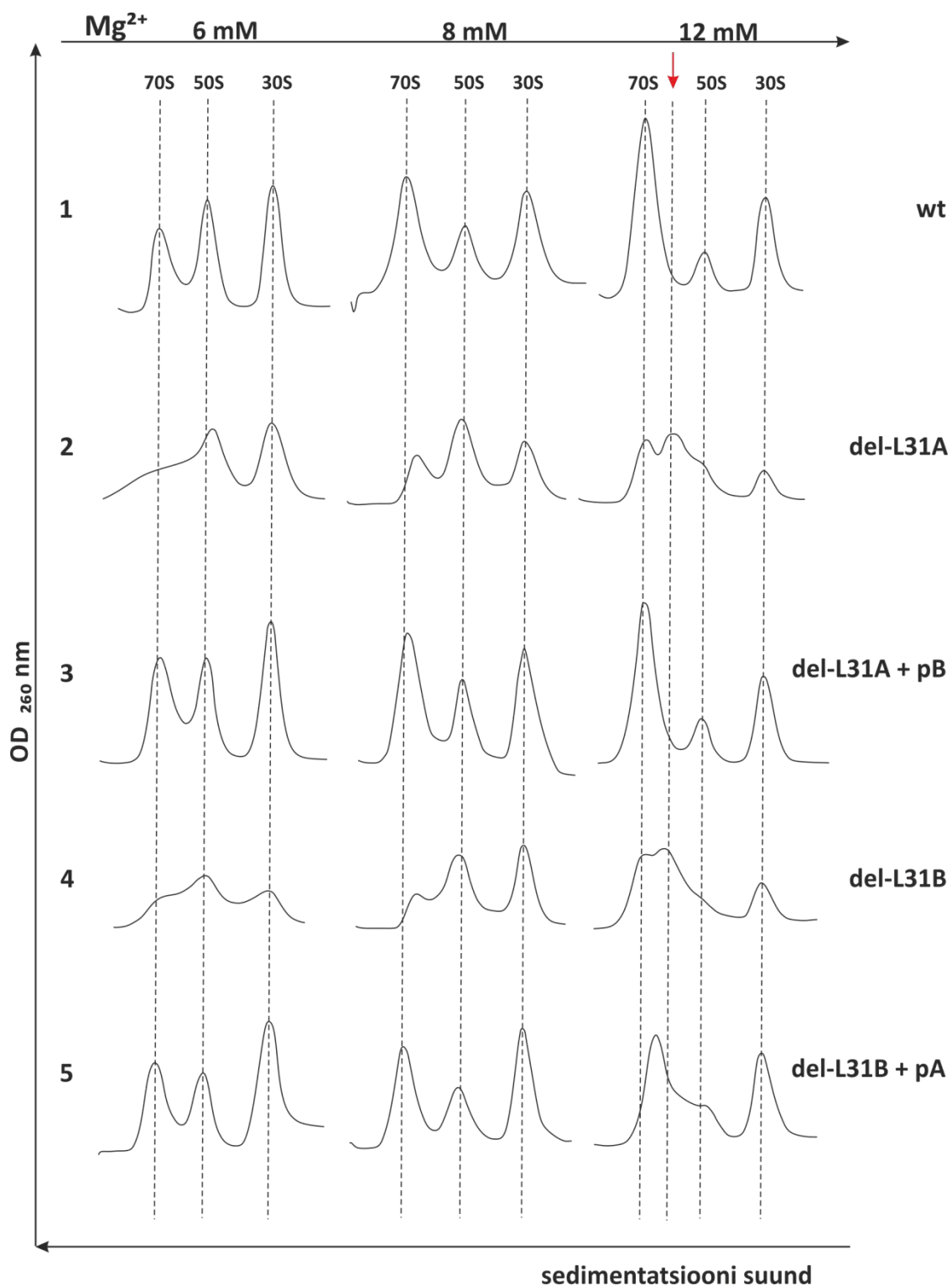
Erinevalt eelmisest katseseeriast, kus lisati puuduvat L31 paraloogi (valku, mille geen oli genoomist deleteeritud), lisati selles seerias olemasolevat L31 paraloogi. Mõlemal juhul ($\Delta L31A + B$ ja $\Delta L31B + A$) sarnanevad assotsiatsiooni gradiendiprofiilid vastavate üksikdeletantide omadega, st paraloogi lisamisel ei suurene 70S ribosoomide osakaal ja 60S piik säilib (joonis 14, rida 4; joonis 15 rida 3). Seega, lisatud „olemasolev“ paraloog ei lülitu vaba ega assotsieerunud 50S subühikuga. Ribosoomide populatsioon jääb ka „olemasoleva“ paraloogi *in vitro* lisamisel heterogeenseks, koosnedes $\Delta L31$ ja kromosoomis kodeeritud L31 paraloogiga alamhulkadest. Küsimus – miks „olemasolev“ paraloog ei lülitu $\Delta L31$ 50S subühikuga *in vitro* – jääb hetkel lahtiseks. „Olemasoleva“ paraloogi lisamisel *in vivo* ehk selle plasmiidisel üleekspressioonil kaob $\Delta L31$ ribosoomide piik $\Delta L31A + pB$ puhul ning väheneb $\Delta L31B + pA$ korral (joonis 16, read 3 ja 5).

Topeltdeletandi assotsiatsioonikatses esinevad L31A ja L31B *in vitro* lisamisel erinevad gradiendiprofiilid. Puhastatud L31B lisamisel suureneb 70S partiklite osakaal võrreldes negatiivse kontrolliga ($\Delta L31AB$) hüppeliselt (joonis 17, read 2 ja 4). $\Delta L31$ ribosoomide populatsiooni tähistav piik on $\Delta L31AB + B$ puhul lühenenud negatiivse kontrolliga võrreldes, kuid see ei kao.

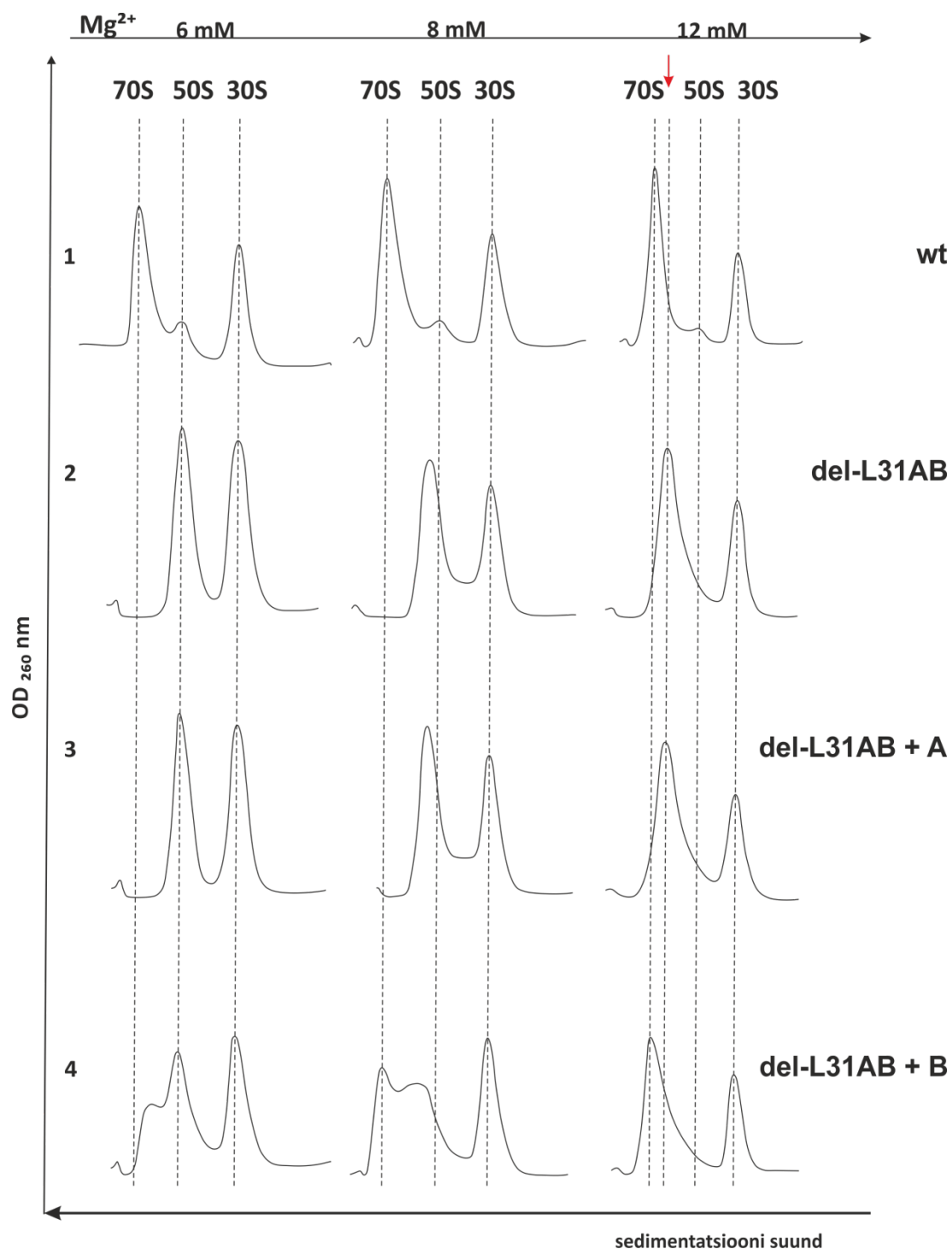
L31A lisamisel $\Delta L31AB$ assotsiatsioonikatsesse jääb vastav gradiendiprofiil sarnaseks topeltdeletandi omaga. Esiteks, L31A lisamisel jääb 70S ribosoomide osakaal minimaalseks (joonis 17, read 2 ja 3). Teiseks, „vahepealse“ piigi esinemine viitab sellele, et $\Delta L31AB$ 50S subühikud assotseeruvad 8 ja 12 mM Mg^{2+} kontsentratsioonil (joonis 17, rida 3). Need tulemused annavad kaudseid tõendeid selle kohta, et L31A ei ole võimeline lülituma topeltdeletandi 50S ega ribosoomi kasutatud katsetingimustes.

Seega võime väita, et L31B afiinsus $\Delta L31$ 50S subühiku suhtes on suurem kui L31A afiinsus. Antud väidet aitaks kinnitada täpsem mass-spektromeetriline analüüs. See selgitab ka tulemusi, kus L31B lisamisel tekkinud heterogeenses ribosoomide populatsioonis on 70S partiklidel suurem osakaal kui $\Delta L31$ partiklidel.

L31A *in vitro* lisamise gradiendiprofiilid viitavad sellele, et see L31 paraloog nähtavasti ei lülitu ribosoomi, sõltumata sellest, kas katses on üksik- või topeltdeletandist pärit 50S subühikud. Järelikult võib põhjus olla L31A valgus kui sellises, mis võib olla puhastamise käigus näiteks inaktiveerunud või ei sisalda tsingiiooni. Kirjandusest on teada, et MBP-L31A seob üht tsingiiooni (Hensley jt., 2011), kuid andmed puuduvad selle kohta, et L31A seondumine vaba või assotseerunud 50S subühikuga sõltuks L31A tsingi sidumisest.



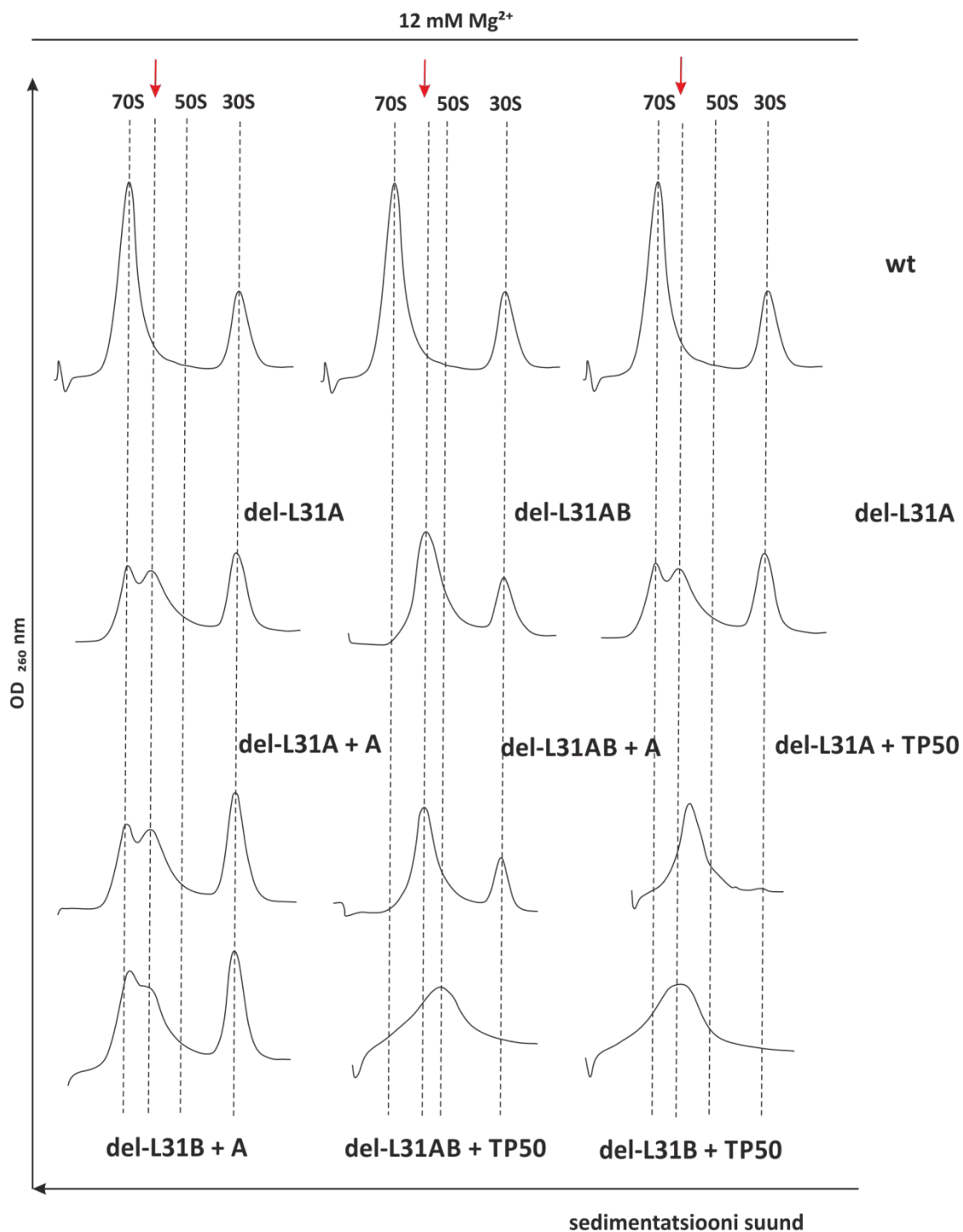
Joonis 16. Eri L31 deletsioonitüvede subühikute assotsiatsioon. Katkendjoontega on tähistatud 70S partiklite, 50S ja 30S subühikute omavaheline kaugus sahharoosigradiendis, punane nool näitab „vahepealset“ 60S piiki. y-teljel optiline tihedus 260 nm juures, x-teljel üleval Mg^{2+} kontsentratsioon ja all sedimentatsiooni suund (paremalt vasakule)



Joonis 17. Subühikute assotsiatsioon, kui $\Delta L31AB$ tüve 50S subühikutele on lisatud puhastatud L31 paralooqe. Enne 50S ja 30S subühikute kokkusegamist lisati 50S subühikutele 2-3-kordses molaarses ülehulgas puhastatud L31A või L31B valku ning eelinkubeeriti 15 minutit ($37^{\circ}C$). Katkendjoontega on tähistatud 70S partiklite, 50S ja 30S subühikute omavaheline kaugus sahharoosigradiendis, punane nool näitab „vahepealset“ 60S piiki. y-teljel optiline tihedus 260 nm juures, x-teljel üleval Mg^{2+} kontsentratsioon ja all sedimentatsiooni suund (paremalt vasakule)

Välistamaks potentsiaalse tsingipuudus tagajärjel tekkinud hüpoteetilist L31A inaktiivsust, korraldati selle paraloogi lisamisega assotsiatsioonikatseid, kus kasutati L31A^(Zn²⁺), mille puhastamisel kasutatud puhvrites oli 0,1 mM Zn²⁺ lõppkontsentratsioon. Ka rakkude kasvatamiseks lisati söötmele tsinki (3 µM ZnSO₄). Vastavad gradiendiprofiilid näitavad, et L31A^(Zn²⁺) lisamine L31A asemel ei mõjuta ΔL31A, ΔL31B ega ΔL31AB tüvedest eraldatud 50S subühikute assotsiatsioonivõimet (joonis 18, +A). Seega ei saa me väita, et eeldatav L31A mitteseondumine („vahepealne“ piik säilib) on põhjustatud tsingipuudusest üleekspresseeritud L31A valgus.

Valgu inaktiivsuse põhjuseks võib olla selle teistsuguse voltumise tagajärjel tekkinud alternatiivne ruumiline struktuur. See on tõenäoline valgu ekspressioonil kõrge koopiarvuga plasmiidilt pBAD, kui rakus on ebaharilikult suures kontsentratsioonis L31A-d. L31A lisamisega assotsiatsioonikatseid korraldati suurest subühikust eraldatud totaalvalguga (TP50). Nähtavasti muutis ühe r-valgu asemel kasutatud rohkem kui 50 r-valgu assotsiatsiooni veelgi komplitseeritumaks, sest subühikud ja ribosoomid ei eristu vastavatel gradiendiprofiilidel (joonis 18, +TP50). Antud meetodika vajab täiendamist, et vabaneda üleliigsetest r-valkudest. Seega jääb selgusetuks, miks erinevalt L31B-st ei lülitu puhastatud L31A ribosoomi.



Joonis 18. Eri L31 deletsioonitüvede subühikute assotsiatsioon. Enne 50S ja 30S subühikute kokkusegamist lisati 50S subühikutele 2–3-kordses molaarses ülehulgas puhastatud L31A^(Zn²⁺) või L31B valku või 50S subühikust eraldatud totaalku (TP50) ning eelinkubeeriti 15 minutit (37°C). Katkendjoontega on tähistatud 70S partiklite, 50S ja 30S subühikute omavaheline kaugus sahharoosigradiendis, punane nool näitab „vahepealset“ 60S piiki. y-teljel optiline tihedus 260 nm juures, x-teljel üleval Mg²⁺ kontsentratsioon ja all sedimentatsiooni suund (paremalt vasakule)

KOKKUVÕTE

E. coli ribosoomide heterogeensust L31 variantide suhtes on näidatud, kuid senini ei ole teadmisi L31 variantsete ribosoomide funktsionaalsetest erinevusest, ka L31 roll ribosoomis on uurimise all. Lähtuvalt avaldatud töödest L31 võimaliku osalemise kohta subühikute vahelises sillas püüti käesoleva töö raames selgitada L31 mõju rakkude kasvufenotüübile ja 70S tekkele *in vivo* ja *in vitro*.

Kasvufenotüübi analüüs näitas, et rakud saavad soodsates keskkonnatingimustes kasvada metsiktüübiga võrreldavalt ka ühe, ükskõik kumma L31 paraloogi olemasolul. Ka topeltdeletsioonitüvi on eluvõimeline, kuid tema kasv eksponentsiaalses faasis on kolmandiku võrra aeglasem kui metsiktüübil. Δ L31AB tüve ligi neli korda pikem lag-faas viitab sellele, et L31 paraloogide roll on seotud kohanemisega keskkonnamuutustele.

Edasine L31 mõju analüüs 70S partiklite osakaalule *in vivo* aitas selgitada kasvufenotüübi katsetes ilmnenud efekte. Δ L31A ja Δ L31B tüvede eri ajapunktide ribosoomide profiilid sarnanesid kuni 48 h ajapunktini metsiktüübi omadega. Seevastu Δ L31AB tüves kirjeldati nii logaritmilises kui statsionaarses kasvufaasis võrreldes üksikdeletantide ja metsiktüübiga märkimisväärselt väiksemat 70S ribosoomide osakaalu.

Analüüsimeks täpsemalt L31 mõju 70S partiklite tekkele, tehti dissotseeritud subühikute ja käesoleva töö raames puhastatud L31 paraloogidega *in vitro* assotsiatsioonikatseid. 60S piigi esinemine nii topelt- kui üksikdeletantide gradiendiprofiilidel viitab sellele, et Δ L31A ja Δ L31B tüvedes esineb heterogeenne 50S subühikute populatsioon. Δ L31AB assotsiatsioonigradiendid viitavad sellele, et L31 on oluline 70S ribosoomide tekkel, ja ühtlasi toetavad *in vivo* profiilidel kirjeldatud. *In vivo* kompensatsioonikatsed näitavad, et mõlemad paraloogid eraldi on olulised 70S tekkel. *In vitro* tulemused viitavad L31B seondumisele ribosoomiga, samas kui L31A jääb teadmata põhjustel inaktiivseks selles kontekstis.

Kokkuvõtvalt võib väita, et L31 paraloogidel on sarnane efekt rakkude kasvukiirusele ja 70S ribosoomi tekkele *in vivo*. Katsetulemused topeltdeletsioonitüvega kinnitavad L31 kui sellise rolli 70S partiklite tekkel *in vivo* ja *in vitro*. Ka ilma L31 valguta 50S subühikud on assotsiatsioonivõimelised nii *in vivo* kui *in vitro*, kuid kolmandiku võrra aeglasema rakkude kasvu põhjal võib eeldada, et selliste ribosoomide translatsioonivõimekus jääb metsiktüüpi ribosoomide omale alla.

On Ribosome Heterogeneity on the Example of *E. Coli* Protein L31

Silva Lilleorg

SUMMARY

The fundamental meaning of ribosome consists in the protein synthesis in all prokaryotic and eukaryotic cells. In addition to elucidating general mechanisms of translation growing attention is paid to the regulation of this crucial process. The discovery of structurally heterogeneous prokaryotic ribosomes present simultaneously in the same cell with the canonical ribosomes has led to speculations that this phenomenon might contribute to the regulation of translation.

As prokaryotic ribosomes are composed of three ribosomal RNAs and more than 50 ribosomal proteins the heterogeneity can principally be expressed at both levels as demonstrated in *E. coli*. The ongoing research in this field is motivated by the opinion that heterogeneity could have functional consequences that for example could help bacteria to coop with difficult environmental conditions.

Focused on the paralogous ribosomal proteins of L31 in *E. coli* this study aims to analyse the effects of L31 variants to the cell growth and to the subunit association *in vivo* and *in vitro*.

The results of this study can be summarized as follows:

1. In favourable conditions (rich media, 37°C) there is basically no difference between the variants of L31 in terms of their effects on growth phenotype (measured in doubling time and in the length of lag phase) that are comparable to those in wild type.
2. However, at least one L31 variant is necessary to maintain the growth phenotype similar to the wild type in favourable conditions. This conclusion is based on the results that the strain lacking both L31 variants grows about one third slower than wild type strain and needs nearly four times more time to reach exponential growth phase.
3. The results of the experiments concerning growth phenotype can be at least partially explained by the association of subunits in different L31 deletion strains. Double deletion strain demonstrates considerable deficiency in 70S ribosomes in the exponential as well as in the stationary phase. In contrast, single deletion strains have

relative amounts of 70S ribosomes and free subunits similar to wild type until 48 h after inoculation.

4. Ribosomal protein L31 is important for 70S particle formation from subunits but not crucial for subunit association *per se* since 50S subunits lacking both L31 variants can associate with 30S subunits *in vivo* and *in vitro*. However, substantially slower growth rate of L31 double deletion strain suggests that ribosomes without L31 variants may have altered functionality compared with ribosomes containing one of the L31 paralogs.

KASUTATUD KIRJANDUS

Akanuma, G., Nanamiya, H., Natori, Y., Nomura, N., Kawamura, F. (2006). Liberation of zinc-containing L31 (RpmE) from ribosomes by its paralogous gene product, YtiA, in *Bacillus subtilis*. *J. of Bacteriol.* 188: 2715–2720.

Alberts, B. (1998). The Cell as a Collection of Protein Machines: Preparing the Next Generation of Molecular Biologists. *Cell* 92: 291–294.

Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A. and Engelberg-Kulka, H. (2009) *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both “death proteins” and “survival proteins”. *PLoS Genet.* 5, e1000390

Arnold, R. J. and Reilly, J. P. (1999). Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem.* 269: 105-112.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A.,

Tomita, M., Wanner, B. L. and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 inframe, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2: 2006 0008.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science.* 289: 905-920.

Baylis, H. A. and Bibb, M. J. (1988). Organisation of the ribosomal RNA genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet.* 211:191-6.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 62: 293-300.

Bertani, G. (2004). Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *J of Bacteriol.* 186: 595–600.

Bickle, T. A., Howard, G. A., Traut, R. R. (1973). Ribosome heterogeneity. The nonuniform distribution of specific ribosomal proteins among different functional classes of ribosomes. *J Biol Chem* 248:4862-4864.

Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H.

- A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277: 1453-1462.
- Brosius, J. (1978). Primary structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L31. *Biochemistry*. 17: 501-508.
- Byrgazov, K., Vesper, O. and Moll, I. (2013). Ribosome heterogeneity: another level of complexity in bacterial translation regulation. *Curr Op in Microbiol* 16:133–139.
- Bügl, H., Fauman, E. B., Staker, B. L., Zheng, F., Kushner, S. R., Saper, M. A., Bardwell, J. C., Jakob, U. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell* 6:349-360.
- Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*. 407:340-8.
- Condon, C., French, S. Squires, C and Squires, C. L. (1993). Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *The EMBO Journal* vol.12 no.11 4305–4315.
- Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., Squires, C. L.(1995). rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J Bacteriol* 177:4152-4156.
- Dabbs, R. E. (1981). The Gene for Ribosomal Protein L31, *rpmE*, Is Located at 88.5 Minutes on the *Escherichia coli* Chromosomal Linkage Map. *J of Bacteriol* 148: 379-382.
- Decatur, W. A., Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* 27:344-351.
- Deusser, E., Wittmann, H. G.(1972). Ribosomal proteins: variation of the protein composition in *Escherichia coli* ribosomes as function of growth rate. *Nature* 238: 269-270.
- Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harms, J. M., Tonevitsky, A. G., Stark, H., Rodnina, M. V. and Wahl, M. C. (2005). Structural Basis for the Function of the Ribosomal L7/12 Stalk in Factor Binding and GTPase Activation. *Cell*.121: 991-1004.
- Dokudovskaya, S., Dontsova, O., Shpanchenko, O., Bogdanov, A. and Brimacombe, R. (1996). Loop IV of S8 ribosomal RNA has contacts both to domain II and to domain V of the 23S RNA. *RNA* 2:146-152.

- Eistetter, A. J., Butler, P. D., Traut, R. R. and Fanning, T. G. (1999). Characterization of *Escherichia coli* 50S ribosomal protein L31. *FEMS Microbiol Lett.* 180: 345-349.
- Frank, J. (2000). The ribosome — a macromolecular machine par excellence. *Chemistry & Biology* 2000, 7: 133-141.
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Staggs, S. M., Van Roey, P., Agrawal, R. K., Harvey, S. C., Sali, A., Chapman, M. S., Frank, J. (2003). Study of the Structural Dynamics of the *E. coli* 70S Ribosome Using Real-Space Refinement. *Cell* 113: 789-801.
- Gilbert, W. V. (2011). Functional specialization of ribosomes? *Trends Biochem Sci.* 36: 127-132.
- Graham, A. I., Hunt, S., Stokes, S. L., Bramall, N., Bunch, J., Cox, A. G., McLeod, C. W. and Poole, R. K. (2009). Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. *J Biol Chem.* 284 :18377-89.
- GST Gene Fusion System. Handbook. GE Healthcare Life Sciences.
- Hard, T., Rak, A., Allard, P., Kloo, L. and Garber, M. (2000). The solution structure of ribosomal protein L36 from *Thermus thermophilus* reveals a zinc-ribbon-like fold. *J Mol Biol.* 296: 169-180.
- Hardy, S. J. S. (1975). The Stoichiometry of the Ribosomal Proteins of *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genet.* 140, 253-274.
- Hemm, M. R., Paul, B. J., Miranda-Rios, J., Zhang, A., Soltanzad, N. and Storz, G. (2010). Small stress response proteins in *Escherichia coli*: proteins missed by classical proteomic studies. *J Bacteriol.* 192: 46-58.
- Hemm, M. R., Paul, B. J., Schneider, T. D., Storz, G. and Rudd, K. E. (2008). Small membrane proteins found by comparative genomics and ribosome binding site models. *Mol Microbiol.* 70: 1487-1501.
- Hensley, M. P., Gunasekera, T. S., Easton, J. A., Sigdel, T. K., Sugarbaker, S. A., Klingbeil, L., Breece, R. M., Tierney, D. L. and Crowder, M. W. (2011). Characterization of Zn(II)-responsive ribosomal proteins YkgM and L31 in *E. coli*. *J Inorg Biochem.*

- Hillebrand, A., Wurm, R., Menzel, A., Wagner, R. (2005). The seven *E. coli* ribosomal RNA operon upstream regulatory regions differ in structure and transcription factor binding efficiencies. *Biol Chem* 386:523-534.
- Kaberdina, A. C., Szaflarski, W., Nierhaus, K. H., Moll, I. (2009). An unexpected type of ribosomes induced by kasugamycin: a look into ancestral times of protein synthesis? *Mol Cell* 33:227-236.
- Kaczanowska, M. and Ryden-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71: 477-494.
- Kapust, R. B, Tözsér, J., Fox, J. D., Anderson, D. J., Cherry, S., Copeland, T. D, Waugh, D. S. (2001). Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.* 14 (12): 993-1000.
- Khaitovich, P., Tenson, T., Kloss, P. and Mankin, A.S. (1999). Reconstitution of functionally active *Thermus aquaticus* large ribosomal subunits with in vitro transcribed rRNA. *Biochemistry.* 38: 1789-1788.
- Kim, H. L., Shin, E. K., Kim, H. M., Ryou, S. M., Kim, S., Cha, C. J., Bae, J., Lee, K. (2007). Heterogeneous rRNAs are differentially expressed during the morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett.* 275:146-152.
- Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P., Silver, P. A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* 131:557-571.
- Korostelev, A., Ermolenko, D. N. and Noller, H. F. (2008). Structural dynamics of the ribosome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12:674–83.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234: 187–208.
- Kurland, C. G., Voynow, P., Hardy, S. J., Randall, L., Lutter, L. (1969). Physical and functional heterogeneity of *E. coli* ribosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 34: 17-24.
- Liiv, A. and O'Connor, M. (2006). Mutations in the Intersubunit Bridge Regions of 23 S rRNA. *J. Biol. Chem.* 2006, 281:29850-29862.
- Lindahl, L. and Zengel, J.M. (1986). Ribosomal genes in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 20: 297–326

- Lopez-Lopez, A., Benlloch, S., Bonfa, M., Rodrigouz-Valera, F., Mira, A. (2007). Intragenomic 16S rDNA divergence in *Haloarcula marismortui* is an adaptation to different temperatures. *J. Mol. Evol.* 65, 687–696
- Loughney, K., Lund, E. and Dahlberg, J. E. (1983). Deletion of an rRNA Gene Set in *Bacillus subtilis*. *J of Bacteriol.* 154: 529-532.
- MacInnes, J. W. (1973). Mammalian Brain Ribosomes are Behaviorally and Structurally Heterogeneous. *Nature New Biology.* 241: 244-246.
- Maeder, C. and Draper, D. E. (2005). A small protein unique to bacteria organizes rRNA tertiary structure over an extensive region of the 50 S ribosomal subunit. *J Mol Biol.* 354: 436-446.
- Makarova, K. S., Ponomarev, V. A. and Koonin, E. V. (2001). Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. *Genome Biol.* 2: RESEARCH 0033.
- Malys, N. and McCarthy, J.E. (2011). Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 991–1003.
- Mauro, V. P., Edelman, G. M. (2002). The ribosome filter hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12031-12036.
- Moll, I. And Engelberg-Kulka, H. (2012). Selective translation during stress in *Escherichia coli*. *Trends in Biochem Sci* vol 37 no 11 493-498.
- Nanamiya, H., Akanuma, G., Natori, Y., Murayama, R., Kosono, S., Kudo, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Park, S. M., Ochi, K. and Kawamura, F. (2004). Zinc is a key factor incontrolling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome. *MolMicrobiol.* 52: 273-283.
- Nanamiya, H. and Kawamura, F. (2010). Towards an elucidation of the roles of the ribosome during different growth phases in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 451–461
- Natori, Y., Nanamiya, H., Akanuma, G., Kosono, S., Kudo, T., Ochi, K. and Kawamura, F. (2007). A fail-safe system for the ribosome under zinc-limiting conditions in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 63: 294–307.

- Nesterchuk, M. V., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A. (2011). Posttranslational modifications of ribosomal proteins in *Escherichia coli*. *Acta Naturae* 3:22-33.
- Nikulin, A., Eliseikina, I., Tishchenko, S., Nevskaya, N., Davydova, N., Platonova, O., Piendl, W., Selmer, M., Liljas, A., Drygin, D., Zimmermann, R., Garber, M. and Nikonov, S. (2003). Structure of the L1 protuberance in the ribosome. *Nature Struct Biol* 10: 104 – 108.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore P. B. and Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 289:920-30.
- Nomura, M., Morgan E. A. and Jaskunas, S. R. (1977). Genetics of Bacterial Ribosomes. *Annual Review of Genetics*. 11: 297-347.
- Pace, N. R. (1973). Structure and Synthesis of the Ribosomal Ribonucleic Acid of Prokaryotes. *Bact. Rev.* 37, 562-603.
- Panina, E.M., Mironov, A.A. and Gelfand, M.S. (2003). Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9912–9917.
- Pulk, A., Liiv, A., Peil, L., Maivali, U., Nierhaus, K. and Remme, J. (2010). Ribosome reactivation by replacement of damaged proteins. *Mol Microbiol.* 75: 801-814.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*. 108: 557-572.
- Ramagopal, S. (1992). Are eukaryotic ribosomes heterogeneous? Affirmations on the horizons. *Biochemistry and Cell Biology* 70: 269-272.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Liquid media for *E.coli*, p. A2.4. *In* J. Sambrook and D. W. Russell (ed.), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., vol.3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M. and Cate, J. H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*. 310: 827-834.
- Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V. t., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R. and Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. 313: 1935-1942.

- Shasmal, M., Chakraborty, B. and Sengupta, J. (2010). Intrinsic molecular properties of the protein-protein bridge facilitate ratchet-like motion of the ribosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 399: 192-197.
- Shen, W. F., Squires, C. and Squires, C. L. (1982). Nucleotide sequence of the *rrnG* ribosomal RNA promoter region of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research.* 10: 3303-3313.
- Stelzl, U., Connell, S., Nierhaus, K. H. and Wittmann-Liebold, B. 2001. Ribosomal Proteins: Role in Ribosomal Functions. P. 1-12. In: eLS
- Steitz, J. A. and Jakes, K. (1975). How ribosomes select initiator regions in mRNA: Base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli* (specificity in polypeptide chain initiation/RNA secondary structure) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72: 4734-4738.
- Tammsalu, T. (2012). *E.coli* ribosoomide heterogeensus – mida näitab proteoomika? Magistritöö. Tartu Ülikool.
- Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A. C., Engelberg-Kulka, H., Moll, I.(2011). Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell* 147:147-157.
- Wada, A. and Sako, T. (1987). Primary structures of and genes for new ribosomal proteins A and B in *Escherichia coli*. *J Biochem.* 101: 817-820.
- Willumeit, R., Diedrich, G., Forthmann, S., Beckmann, J., May, R. P, Stuhmann, H. B. and Nierhaus, K, H. (2001). Mapping proteins of the 50S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1520: 7-20
- Wilson, D. N. and Nierhaus, K. H. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40: 243-267.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T. and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature.* 407: 327-339.
- Wittmann, H. G. (1982). Components of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem.* 51: 155-183.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. and Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*. 292: 883-896.

Xue, S., Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature Rev Mol Cell Biol* 13 (6): 355-369.

Zhang, W., Dunkle, J. A., Cate, J. H. D. (2009). Structures of the Ribosome in Intermediate States of Ratcheting. *Science*. 325: 1014-1017.

Zhao, Q., Öfverstedt L. G., Lars-Gfran, Skoglund, U. and Isaksson, L. A. (2004). Morphological variation of individual *Escherichia coli* 50S ribosomal subunits in situ, as revealed by cryo-electron tomography. *Experimental Cell Research* 300: 190– 201.

Zhou, J and Rudd, K. E. (2013). EcoGene 3.0 *Nucl. Acids Res.* 41: D613-D624.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

EcoGene 3.0, <http://www.ecogene.org/>

programm ProtParam, <http://web.expasy.org/protparam/>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Silva Lilleorg

(sünnikuupäev: 05.09.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Ribosoomide heterogeensusest *Escherichia coli* L31 näitel,

mille juhendaja on Aivar Liiv, *PhD*,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 26.05.2017 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014